



**Utilidad clínica de la detección y cuantificación
de ADN y ARN en plasma de pacientes con
carcinoma de células renales.**

TESIS DOCTORAL
CARLOS MARTÍNEZ SANCHIZ
MADRID 2019

DIRECTORES:
Prof. Dr. ANTONIO SANTIAGO SALINAS SÁNCHEZ
Dra. DOLORES C. GARCÍA OLMO

Este trabajo está dedicado a mi familia:

A mis padres, Vicente y Loles, su esfuerzo y sacrificio me ha permitido poder llegar hasta aquí.

A mi mujer, Rosa, por su incondicional apoyo.

Y a mis hijos, Carlos y Pablo.

AGRADECIMIENTOS:

Esta obra que aquí comienza es la culminación del trabajo y colaboración desinteresada de muchas personas y entidades que, durante estos 3 años, han contribuido y posibilitado su desarrollo, y por ello, desde aquí, quiero expresar mi más sincero agradecimiento a todas y cada una de ellas.

A mis directores de tesis, el profesor Dr. Antonio Salinas Sánchez y la Dra. Dolores García Olmo, por ayudarme a iniciarme en el mundo de la investigación clínica y de laboratorio, por vuestro tiempo, vuestros consejos, sugerencias, correcciones, apoyo y vivencias compartidas en este proyecto.

A mi tutor de tesis, el profesor Dr. Damián García Olmo, por su inestimable ayuda en el presente estudio y su dedicación en la investigación con nuestro centro.

A María Granada Picazo Martínez, por su gran trabajo, su colaboración profesional y su impagable implicación personal en este proyecto.

Al Dr. José Miguel Giménez Bachs, por sus acertados consejos para la realización y redacción de este trabajo.

A los patólogos, Dres. Manuel Atiénzar y Teresa Nam Cha, por su estrecha colaboración desde el Servicio de Anatomía Patología.

A todos los miembros del Servicio de Urología del Hospital General de Albacete, por su colaboración.

A la Gerencia de Atención Integrada de Albacete, por poner a mi disposición la logística humana y técnica de su Unidad de Investigación, Biobanco de tumores y hospitalización para este proyecto.

A Ángela Díaz Piqueras y Ángel Arriaga, por su excelente trabajo diario en el Biobanco de tumores del Hospital General de Albacete.

A Ana Belén Flores y a M.^a Dolores Castillo, así como a toda la enfermería de la planta de Urología y del quirófano nº 8 del Hospital General de Albacete, por su colaboración e implicación.

A María José Herreros Navarro, por su colaboración desde la Unidad de Investigación de la GAI de Albacete para todo lo que hemos podido necesitar.

A la Asociación Contra el Cáncer de Elche de la Sierra (ACCESI), por su ayuda y financiación para este proyecto. Desde aquí mi más sincero reconocimiento a la gran labor que realizan.

A la Fundación para la Investigación en Urología (FIU) y a la Asociación Castellano- Manchega de Urología (ACMU), por su contribución económica para este estudio.

A todos y cada uno de vosotros, ¡gracias!

ÍNDICE DE ABREVIATURAS (por orden alfabético):

3p: brazo corto del cromosoma 3	HIF: Factor inducible por la hipoxia
ADN: ácido desoxirribonucleico	HIF-Beta: factor inducible por hipoxia beta
ADNc: ADN complementario.	HTA: Hipertensión arterial
ALT: mecanismo alternativo d alargamiento del telómero	hTERT: human telomerase reverse transcriptase
ARN: ácido ribonucleico	hTR: human telomerase ARN
ARNm: ARN mensajero	IC: intervalo de confianza
AUC: Área bajo la curva	IFN alfa: interferón alfa
BAP1: proteína asociada al gen <i>bcra</i>	IL-2: Interleucina 2
CaIX: Anhidrasa carbónica IX	IL-6: Interleucina 6
CCR: Carcinoma de Células Renales	IMC: Índice de Masa Corporal
CCRcc: Carcinoma de células renales subtipo células claras	IRC: Insuficiencia renal crónica
CEA: antígeno carcinoembrionario	LES: Lupus eritematoso sistémico
cfDNA: cell-free DNA	LES: Lupus eritematoso sistémico
cfNA: Ácidos nucleicos circulantes	miARN: microARN
CircRNA; ARN circulante	mTOR: Mamalian target of rapamycin
Cp: Crossing Point	OMS: Organización Mundial de la Salud
CTCs: células tumorales circulantes	PBRM1: gen <i>polybromo 1</i>
ctDNA: ADN de la célula tumoral	PCR-RT: Reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real.
Curva <i>ROC</i> : curva característica operativa del receptor.	PET-TC:
DE: Desviación estándar	PSA: antígeno Prostático Específico
E: Especificidad	PSA: Antígeno prostático específico
EDTA: ácido etilendiaminotetraacético	pVHL: proteína VHL
Fg/ml: femtogramo por mililitro	pVHL: proteína Von Hippel Lindau
GAI Albacete: Gerencia Atención Integrada de Albacete.	RMN: Resonancia Magnética Nuclear.
GAPDH: gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa.	RR: Riesgo Relativo
Gen VHL: Gen Von Hippel Lindau	S: Sensibilidad
HIF.alfa: factor inducible por hipoxia alfa	Sistema TNM: Tumor – Nódulo - Metástasis

SPSS: Statistical Package for the Social Science

UCAI: ultrasonidos centrados de alta intensidad

UICC: Unión internacional contra el cáncer

VEGF: Factor de crecimiento del endotelio vascular

VHB: Virus hepatitis B

ÍNDICE DE TABLAS.

Tabla 1. Clasificación por estadios T, N y M.

Tabla 2. Estadios TNM.

Tabla 3. Cronología bibliográfica sobre el origen de los ácidos nucleicos en plasma.

Tabla 4. Distribución de lateralidad de las lesiones renales y clínica de debut en los pacientes con CCR.

Tabla 5 Distribución de los tumores analizados en el estudio según clasificación TNM.

Tabla 6. Expresión de hTERT ARNm en muestras tumorales según las distintas variables anatomopatológicas analizadas en el estudio.

Tabla 7. *Crossing Point* de hTERT ARNm en muestra de CCR según las distintas variables anatomopatológicas analizadas en el estudio.

Tabla 8. Número de réplicas en la expresión de hTERT ARNm en muestra de tejido CCR según las variables analizadas en el estudio.

Tabla 9. Relación de la presencia o ausencia de ADN hTERT pre-nefrectomía en el plasma de las muestras de los pacientes con CCR con las variables analizadas en el estudio.

Tabla 10. Evolución de la detección en muestras de plasma de ADN hTERT tras la nefrectomía según el estadio N.

Tabla 11. Cambios en los niveles de hTERT ADN en muestras de plasma prequirúrgicas vs anuales en relación con el grado de Furhman.

Tabla 12. Distribución de media e IC95% de GAPDH ADN en plasma preoperatorio según las diferentes variables clínico-patológicas.

Tabla 13. Niveles medios de ADN GAPDH en muestra de plasma al año de la nefrectomía en función de las diferentes variables del estudio.

Tabla 14. Modificación en los niveles de ADN GAPDH en muestras de plasma postoperatorias y al año de la nefrectomía

Tabla 15. Representación de valores medios de ADN plasmático total en muestra de seguimiento según las diferentes variables clínico-patológicas analizadas.

Tabla 16. Modificación de los niveles de ADN total en muestras de plasma postoperatorias vs muestra de seguimiento.

Tabla 17. Asociación estadística de los diferentes marcadores estudiados con las variables anatomopatológicas y clínicas analizadas

Tabla 18. Valores de las áreas bajo la curva (ROC) de los diferentes biomarcadores analizados.

Tabla 19. Resumen bibliográfico sobre la actividad telomerasa en cáncer renal.

ÍNDICE DE FIGURAS.

Figura 1. Imagen macro y microscópica de CCR.

Figura 2. Esquema de localización de los diferentes subtipos histológicos en la nefrona según la clasificación de Hilderberg.

Figura 3. Imagen de eco y TC abdominal.

Figura 4. Esquema del funcionamiento de HIF.

Figura 5. Teoría del origen del ADN libre circulante y las metástasis en el cáncer.

Figura 6. Imagen de microscopía óptica de un cromosoma con detalle de los telómeros.

Figura 7. Diagrama del proceso de toma de muestras.

Figura 8. Representación histológica de los diferentes subtipos histológicos de CCR.

Figura 9. Esquema del procesamiento de muestras de tejido CCR.

Figura 10. Patrón de temperaturas empleado en la amplificación del ADNc de GAPDH.

Figura 11. Patrón de temperaturas empleado en la amplificación del ADNc de hTERT.

Figura 12. Esquema del análisis de las muestras de tejidos.

Figura 13. Resultado gráfico de una prueba de PCR-RT para amplificación de hTERT ADNc.

Figura 14. Esquema de la determinación de los biomarcadores en plasma en los diferentes momentos del estudio.

Figura 15. Esquema de la extracción y cuantificación de ADN plasmático.

Figura 16. Representación gráfica de la distribución la edad de casos y controles.

Figura 17. Distribución en porcentaje de los distintos abordajes quirúrgicos realizados.

Figura 18. Distribución de los diagnósticos histopatológicos de las muestras tumorales incluidas en el estudio.

Figura 19. Distribución del grado de Fuhrman de los tumores de la serie.

Figura 20. Curva de supervivencia y progresión de los pacientes del estudio.

Figura 21: Distribución de la expresión de hTERT ARNm en tejidos tumorales según la histología.

Figura 22. Representación del Cp según la histología de las muestras tumorales analizadas en el estudio.

Figura 23. *Crossing Point* de hTERT ARNm en el tejido tumoral analizado en estadio cN.

Figura 24. *Crossing Point* de hTERT ARNm en tejido tumoral analizado según estadio pM.

Figura 25. *Crossing Point* de hTERT ARNm en tejido tumoral analizado según estadio TNM.

Figura 26. Detección de 3 réplicas positivas a hTERT ARNm en muestras de tejido tumoral según el estadio TNM.

Figura 27. Representación de los valores medios de ARNm GAPDH en plasma en los diferentes momentos del estudio.

Figura 28. Relación entre la existencia o ausencia de hTERT ADN en plasma prenefrectomía con las variables grado de Furhman y progresión de enfermedad.

Figura 29. Representación de los valores medios de hTERT ADN plasmático en los diferentes momentos del estudio y en voluntarios sanos.

Figura 30. Comparación de los niveles de GAPDH ADN en muestras de plasma preoperatorio en las diferentes variables clínico-patológicas analizadas en el estudio.

Figura 31. Representación de los niveles medios de GAPDH ADN en muestras plasmáticas en los diferentes momentos del estudio.

Figura 32. Cambios en los niveles de ADN total en muestra de plasma en controles y en los diferentes momentos analizados en el estudio.

Figura 33. Curva ROC. Rentabilidad de los valores de GAPDH ADN al año de seguimiento, en el diagnóstico de progresión o exitus de los pacientes del estudio.

Figura 34. Curva ROC. Rentabilidad de los valores de GAPDH ARNm postoperatorio, en el diagnóstico de progresión o exitus de los pacientes del estudio.

1. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1 CANCER RENAL. ASPECTOS GENERALES	2
1.1.1 Epidemiología.....	2
1.1.2 Características clínicas e histopatológicas.....	3
1.1.3 Diagnóstico, pronóstico y tratamiento.....	6
1.1.4 Origen del cáncer renal.....	11
1.1.5 Marcadores tumorales.	13
1.2 ÁCIDOS NUCLEICOS CIRCULANTES EN PLASMA Y CÁNCER	16
1.2.1 Primeros estudios.	16
1.2.2 Valor clínico del ADN y ARN libres circulantes.....	17
1.3 CÁNCER Y TELOMERASA. GENERALIDADES	20
1.3.1 Actividad telomerasa en tumores.....	22
2. JUSTIFICACIÓN, OBJETIVOS E HIPÓTESIS	24
2.1. JUSTIFICACIÓN	25
2.2. OBJETIVOS:.....	27
2.2.1 Objetivo general.....	27
2.2.2 Objetivos específicos.....	27
2.3 HIPÓTESIS:	28
2.3.1 Hipótesis conceptual.....	28
2.3.2 Hipótesis operativas.....	28
2.3.3 Hipótesis estadísticas	28
3. MATERIALES Y MÉTODOS.....	30
3.1. DISEÑO DEL ESTUDIO Y POBLACIÓN	31
3.1.1 Criterios de inclusión.	32
3.1.2 Criterios de exclusión.....	32
3.2 RECOGIDA DE DATOS.....	32
3.3.1 Procesamiento inicial de las muestras de sangre y aislamiento del plasma.	34
3.3.2 Análisis de pieza tumoral	35
3.3.2 a Estudio histológico:	35
3.3.2 b Extracción de ARN en pieza tumoral.....	36

3.3.2 b1 Detección y cuantificación de GAPDH ARNm en pieza tumoral.	37
3.3.2 b2 Detección de hTERT ARNm en pieza tumoral.	39
3.3.3. Análisis de plasma:	41
3.3.3 a Extracción y cuantificación de ADN plasmático.	41
3.3.3 b Extracción y cuantificación de ARNm plasmático.....	43
3.4 VARIABLES DEL ESTUDIO	44
3.4.1 Base de datos	44
3.4.2 Variables independientes del estudio.	44
3.4.2 a Variables socio-demográficas:	44
3.4.2 b Variables del paciente:	44
3.4.2.c Variables relacionadas con el tumor:	45
3.4.2.d Variables relacionadas con la intervención quirúrgica:	47
3.4.2.e Variables relacionadas con tratamientos adyuvantes:	47
3.4.3 Variables dependientes del estudio.	47
3.4.4. Análisis estadísticos.	48
3.4.4.a Análisis descriptivo.....	48
3.4.4.b Análisis bivariante.	49
3.4.4.c Análisis supervivencia.....	49
3.4.4.d Análisis de rendimiento diagnóstico de las determinaciones de ADN y ARNm circulante.	50
3.4.5 Consideraciones éticas.	51
4. RESULTADOS	52
4.1. ANÁLISIS DESCRIPTIVO DE LA MUESTRA, VARIABLES SOCIODEMOGRÁFICAS, CLÍNICAS Y PATOLÓGICAS	53
4.1.1. Edad.	53
4.1.2 Sexo.	53
4.1.3 Lateralidad y clínica.	54
4.1.4 Factores de riesgo relacionados con CCR	54
4.1.5 Variables relacionadas con la intervención quirúrgica.	55
4.1.5.a Tipo de técnica quirúrgica.	55
4.1.5.b Duración de la hospitalización.	55
4.1.5.c Aparición de complicaciones.	55
4.1.6 Variables relacionadas con el tumor.	56
4.1.6.a Número de lesiones y tamaño tumoral.....	56

4.1.6.b Histología.	56
4.1.6.c. Grado de Furhman.....	57
4.1.6.d. Estadio tumor primario (pT).....	57
4.1.6.e Afectación ganglionar regional (N).....	57
4.1.6.f Metástasis a distancia (M).....	58
4.1.6.g Afectación por estadios TNM.	58
4.1.7 Necesidad de tratamientos adyuvantes.....	59
4.1.7.a Quimioterapia.	59
4.1.7.b Radioterapia.	59
4.1.8 Seguimiento.....	59
4.2.- DETECCIÓN DE ARNm EN MUESTRA DE TEJIDO	60
4.2.1 Detección de GAPDH ARNm en tejido tumoral y en muestra de tejido sano adyacente al tumor.	60
4.2.2 Detección de hTERT ARNm en tejido tumoral y en tejido sano adyacente al tumor.	60
4.3.- DETECCIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE ARNm EN PLASMA.....	67
4.3.1.- Detección y cuantificación de hTERT ARNm en muestra de plasma.	67
4.3.2 Detección y cuantificación de GAPDH ARNm en plasma.	67
4.3.2.a GAPDH ARNm en muestra de plasma preoperatoria.	67
4.3.2.b GAPDH ARNm en muestra de plasma postoperatoria.....	68
4.3.2.c GAPDH ARNm en muestra de plasma al año de la nefrectomía.....	69
4.4.- DETECCIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE ADN EN PLASMA	71
4.4.1.- Detección y cuantificación de hTERT ADN en muestras de plasma.....	71
4.4.1.a hTERT ADN en muestra de plasma preoperatoria.	71
4.4.1.b hTERT ADN en muestra de plasma postoperatoria.	73
4.4.1.c hTERT ADN en muestra anual de plasma.	74
4.4.2.- Detección y cuantificación de GAPDH ADN en muestras de plasma.....	76
4.4.2.a GAPDH ADN en muestra de plasma preoperatoria.....	76
4.4.2.b GAPDH ADN en muestras de plasma postoperatorio.....	78
4.4.2.c GAPDH ADN en muestra de plasma al año de la nefrectomía.	79
4.4.3a. ADN total en muestra prequirúrgica.	82
4.4.3.b ADN total en muestra postoperatoria.....	83
4.4.3.c ADN total en muestra anual.....	83
4.5.- RENDIMIENTO DIAGNÓSTICO DE LA CUANTIFICACIÓN DE ADN Y ARNm EN PLASMA	89
4.5.1.- Análisis de las curvas ROC.	89
4.5.2.- Análisis de la sensibilidad y especificidad.	91

5. DISCUSIÓN.....	92
5.1 COMENTARIOS AL MÉTODO	93
5.1.1 Características de las poblaciones del estudio.	93
<i>5.1.1.a. Pacientes del grupo control.</i>	<i>93</i>
<i>5.1.1.b. Pacientes con carcinoma de células renales.</i>	<i>93</i>
5.1.2 Comentario al método de laboratorio.....	94
<i>5.1.2.a Elección de ARNm y ADN plasmáticos como biomarcadores en CCR.</i>	<i>94</i>
<i>5.1.2.b. Técnicas para el estudio de los ácidos nucleicos en plasma en el CCR.</i>	<i>96</i>
5.1.3. Limitaciones del estudio.....	97
5.2.- VALOR DEL ANÁLISIS DE ARNm EN MUESTRA DE TEJIDOS CON CCR Y EN TEJIDOS SANOS ADYACENTES AL TUMOR	99
5.3.- ESTUDIO DE LA UTILIDAD CLÍNICA DE LA DETECCIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE ADN Y ARNm EN PLASMA DE PACIENTES CON CÁNCER DE CÉLULAS RENALES.....	102
5.3.1. Valor del ADN en plasma de pacientes con carcinoma de células renales.	102
<i>5.3.1.a. Valor de la detección de hTERT ADN en plasma de pacientes con carcinoma de células renales:</i>	<i>102</i>
<i>5.3.1.b. Valor de la detección de GAPDH ADN en plasma de pacientes con carcinoma de células renales:</i>	<i>104</i>
5.3.2. Valor de la cuantificación de otras secuencias de ADN total en muestra de plasma de pacientes con carcinoma de células renales.....	105
5.3.3. Valor del ARNm en plasma de pacientes con carcinoma de células renales: ..	106
<i>5.3.3.a Valor de la detección de GAPDH ARNm en plasma de pacientes con carcinoma de células renales.</i>	<i>107</i>
<i>5.3.3.b Valor de la detección de hTERT ARNm en plasma de pacientes con carcinoma de células renales.</i>	<i>108</i>
5.4. COMENTARIO FINAL.	111
6. CONCLUSIONES.....	113
7. RESUMEN.....	115
7.1.- INTRODUCCIÓN.....	116
7.2.- OBJETIVOS.....	116
7.3.- SUJETOS, MATERIALES Y MÉTODOS	117
7.4.- RESULTADOS.....	118
7.5.- CONCLUSIONES.....	119

8. BIBLIOGRAFÍA.....	121
9. ANEXOS	128
ANEXO I: Consentimiento informado Biobanco.....	129
ANEXO II. Secuencia de los cebadores y de la sonda Taqman utilizados.	131
ANEXO III: Publicaciones, comunicaciones y premios.....	132

1. INTRODUCCIÓN

1.1 CÁNCER RENAL. ASPECTOS GENERALES

1.1.1 Epidemiología.

El carcinoma de células renales (CCR) es la 11ª neoplasia en frecuencia en los varones y la 15ª en mujeres. Representa el 2% de todos los tumores en el ser humano y es la 3ª neoplasia urológica en frecuencia. Tiene una relación varón/mujer de 1,5/1 y su tasa de incidencia más alta aparece en el tramo de edad de 70 a 75 años.⁽¹⁾

El CCR es la lesión sólida más frecuente en el riñón y representa aproximadamente el 90% de todos los tumores renales malignos. Engloba diferentes tipos con características histopatológicas y genéticas específicas.⁽²⁾

En Europa, el CCR tuvo una incidencia media de 12,1 casos por 100.000 habitantes/ año en 2012, lo que representa un total aproximado de 84.400 casos nuevos.⁽¹⁾
³⁾ Se ha observado que la menor incidencia de CCR se localiza en el norte de Europa (Suecia, Finlandia y Holanda) y la mayor en de los países del este en Europa, siendo la Republica Checa el lugar donde se registran las mayores tasas de incidencia del CCR a nivel mundial.⁽¹⁾

Según datos de 2017 recogidos en el *European Network of Cancer Registries*⁽⁴⁾, este tumor produce el 3,2% de la mortalidad por cáncer en Europa, con una tasa de mortalidad de 4,7 casos por 100.000 habitantes/ año.

En España se ha observado un aumento de incidencia hasta el año 2000, tanto en varones como en mujeres, con aumento constante de la mortalidad. Las previsiones hasta el año 2020 sobre el cáncer renal revelan una tendencia al alza en su incidencia, mortalidad y prevalencia, de ahí la importancia de un estudio adecuado y la necesidad de explorar la posibilidad de un diagnóstico precoz.⁽⁵⁾

Respecto a sus factores de riesgo destacan el tabaquismo, la obesidad y la exposición ocupacional. Se ha establecido una relación causal con el tabaco, siendo el riesgo relativo (RR) de padecerlo de 1,54 en varones y de 1,22 en mujeres fumadoras.⁽⁶⁾ Un Índice de Masa Corporal (IMC) elevado también se asocia con aumento de riesgo de presentar CCR. La exposición laboral a sustancias como asbesto, cadmio, benceno,

herbicidas y disolventes, implica riesgo elevado de presentar un tumor renal. Otros factores etiológicos menos frecuentes son el consumo deficitario de frutas y verduras (en particular en el área de Europa Central), la presencia de hipertensión arterial (HTA) y su tratamiento, así como factores de predisposición genética. La prevención más eficaz consiste en evitar el tabaquismo y la obesidad.⁽¹⁾

1.1.2 Características clínicas e histopatológicas.

El CCR es una entidad clínica que se define por su heterogeneidad, con múltiples formas de presentación a nivel clínico e histológico que lo convierten en una patología compleja. Existe actualmente una tendencia al diagnóstico incidental, si bien esto no siempre fue así. El diagnóstico incidental está facilitado por las mejoras tecnológicas en las pruebas de imagen, así como la accesibilidad relativamente frecuente a las mismas. Esto permite detectar masas renales de pequeño tamaño en situaciones clínicamente indolentes, que mejoran el pronóstico y facilitan el tratamiento de esta patología, dado que implican lesiones de menor tamaño y de estadios más favorables.⁽⁷⁾ Previamente al uso de estas tecnologías, el diagnóstico era clínico, ensombreciendo así el pronóstico del CCR, pues la mayoría de las veces implicaba una enfermedad localmente avanzada o con diseminación a distancia en el momento del diagnóstico, de escasa respuesta al tratamiento y mal pronóstico. Son clásicos los síntomas de dolor lumbar, asociado a masa palpable y hematuria, síntomas cada vez de menor frecuencia en nuestro medio, pero que traducen un pronóstico ominoso en los casos en los que se presentan y la existencia de síntomas sistémicos secundarios a metástasis o cuadros paraneoplásicos.

El diagnóstico histológico se obtiene tras el análisis de la pieza de nefrectomía por parte del uropatólogo. La Organización Mundial de la Salud (OMS), actualizó en 2016 su clasificación de los subtipos histológicos de CCR⁽⁸⁾, en base a cambios histológicos y genéticos, siendo los más frecuentes los CCR de células claras (CCRcc; 60-70%), CCR papilar (15-20%) y CCR cromóforo (5-7%). Defiende también la existencia de otros subtipos de menor frecuencia, basados en su localización anatómica (carcinoma de los ductos colectores), su asociación con enfermedades renales (CCR asociado a la enfermedad quística), CCR asociado a translocaciones familiares y a formas hereditarias.⁽⁸⁾ Asimismo, pueden aparecer presentaciones histológicas consideradas como benignas, como los oncocitomas.⁽⁹⁾ (Figura 1).

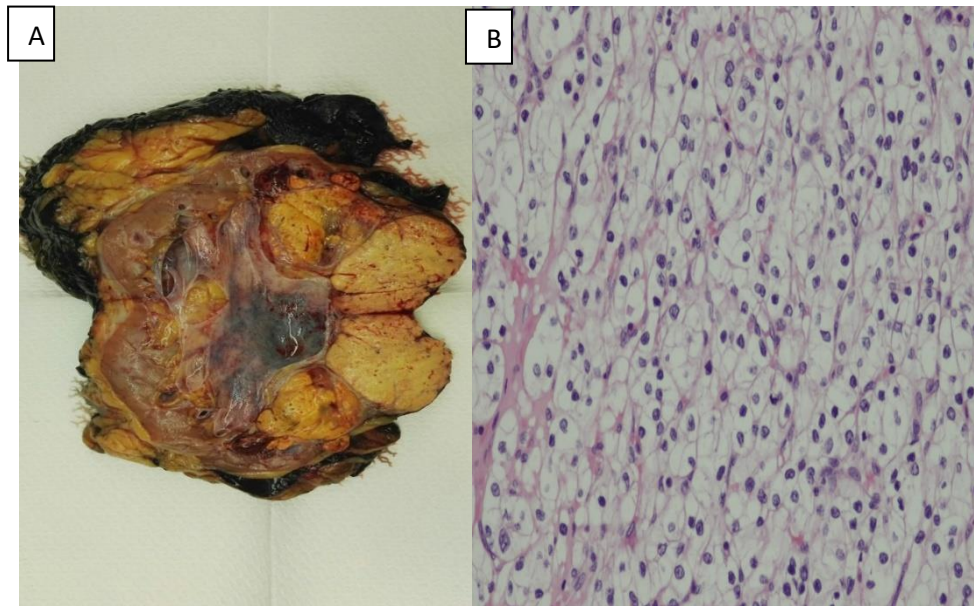


Figura N° 1. A) Imagen macroscópica de CCR. B) Imagen microscópica de CCR, con células de citoplasma amplio y eosinófilo, con halos claros perinucleares, compatible histológicamente con CCR cromófobo.

El CCRcc es la forma de presentación más frecuente del CCR, su origen se localiza a nivel de la nefrona proximal y se asocia característicamente a la pérdida del cromosoma 3p. Puede aparecer como una forma esporádica, presentándose en la 6° década de la vida, o asociado a formas familiares, principalmente a la enfermedad de Von Hippel Lindau⁽¹⁰⁾ (Figura 2).

El carcinoma papilar renal se asocia a trisomías en los cromosomas 7 y 17, y a la pérdida del cromosoma Y. Se clasifican en tipo 1, de bajo grado y citogenéticamente asociado a alteraciones del brazo corto del cromosoma 17 (17q), y en tipo 2, de mayor agresividad clínica y asociado a alteraciones en el brazo corto del cromosoma 9 (9q). El origen topográfico del carcinoma papilar se ha establecido clásicamente a nivel del túbulo contorneado proximal⁽¹⁰⁾ (Figura 2).

El subtipo cromóforo de CCR se origina a nivel de la nefrona distal cortical y se asocia con la pérdida de cromosomas 1, 2, 6, 10, 13, 17 y 21 (Figura 2). La pérdida del alelo 17 en este subtipo histológico se asocia con el síndrome de Birt-Hogg-Dubé.⁽¹⁰⁾

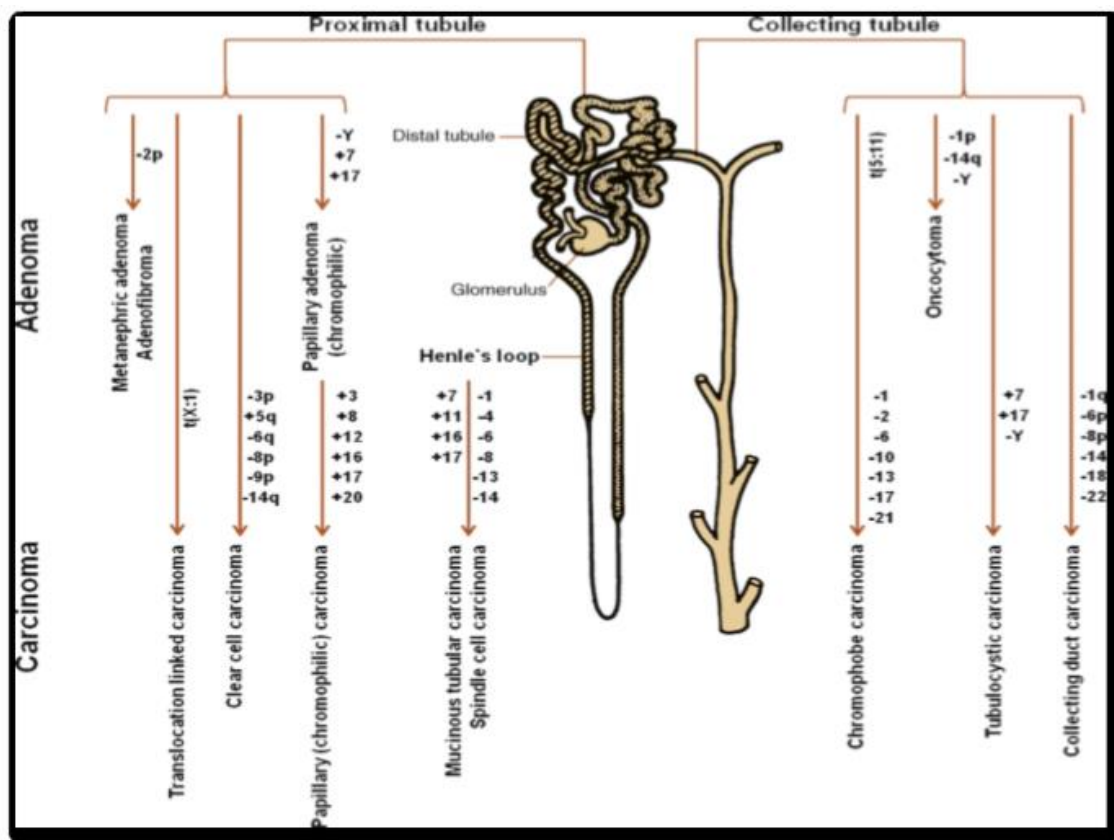


Figura 2-Esquema de localización de los diferentes subtipos histológicos en la nefrona según la clasificación de Hilderberg.⁽²⁾

Otro dato anatómo-patológico de gran importancia es la valoración de la diferenciación nuclear de Furhman, cuyo sistema de clasificación (grados de 1 a 4) se considera un factor pronóstico independiente y uno de los más importantes en el CCR.⁽¹¹⁾

El diagnóstico histológico incluye, además del tipo de CCR y del grado Furhman, la valoración de características sarcomatoides, presencia de invasión vascular y necrosis tumoral, invasión del sistema colector y de la grasa perirrenal, así como las categorías T y N del sistema TNM.

1.1.3 Diagnóstico, pronóstico y tratamiento.

En la actualidad, el diagnóstico es fundamentalmente radiológico e incidental, derivado de la accesibilidad a pruebas de imagen como la ecografía, la tomografía axial (Figura 3) y la resonancia magnética. Estas pruebas son empleadas de forma generalizada en el estudio de síntomas abdominales inespecíficos y, en gran número de pacientes se produce el hallazgo incidental del tumor renal.

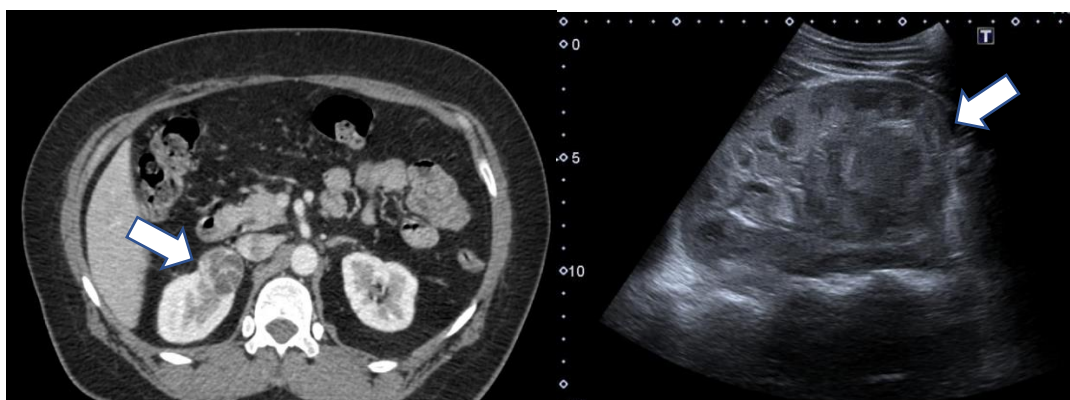


Figura 3. Imagen de eco y TC Abdominal: masa en polo superior de riñón derecho de 3 cm de diámetro (flecha), hallada de forma incidental en el estudio de un cuadro de dolor abdominal de origen digestivo.

El sistema TNM 2017^(12, 13) (Tabla 1), es el “*gold standard*” para la clasificación recomendada en el análisis clínico, pronóstico y científico del CCR. Su valor pronóstico ha sido refrendado en diferentes estudios.⁽¹⁴⁾ Se considera uno de los más fiables y robustos predictores de resultados oncológicos tras la nefrectomía, además facilita la identificación de pacientes en riesgo de recurrencia y progresión, que podrían beneficiarse de terapias adyuvantes, en función de su estadiaje (Tabla 2).

En la mayoría de los pacientes nos encontramos ante una enfermedad localizada, aunque la afectación metastásica, regional o a distancia, al diagnóstico de la enfermedad se presenta en 17% en CCR cromóforo y 28% en CCRcc,⁽¹⁾ si bien esta situación empeora el pronóstico en los pacientes en los que aparece. La afectación metastásica se limita hasta en el 70% de los pacientes que la presentan, a un solo órgano (40% pulmón y 22% ósea).⁽¹⁵⁾

La supervivencia actual a 5 años, según datos de 2017 sobre CCR del *European Network of Cancer Registries*,⁽⁴⁾ es superior al 60% en los diferentes tipos histológicos,

cifra que ha mejorado respecto a datos previos, debido al aumento del diagnóstico incidental de este tipo tumores.⁽¹⁶⁾

Tabla 1. Clasificación por estadios T, N y M.⁽¹³⁾

Estadio T	
Categoría T	Criterio T
Tx	El tumor primario no se puede confirmar
T0	No hay evidencia de tumor primario
T1a	Tumor ≤ 4 cm en diámetro mayor, limitado al riñón.
T1b	Tumor ≤ 4 cm en diámetro mayor, limitado al riñón.
T2	Tumor 4-7 cm en diámetro mayor, limitado al riñón.
T2a	Tumor >7 cm, pero ≤ 10 cm en diámetro mayor, limitado al riñón.
T2b	Tumor >10 cm, limitado al riñón
T3	Tumor se extiende a las venas principales o a tejidos perirrenales, pero no afecta a glándula suprarrenal ipsilateral ni más allá de la fascia de Gerota.
T3a	Tumor se extiende dentro de la vena renal o sus ramas segmentarias, ó invade el sistema pielocalicial, ó invade la grasa del seno renal y/o perirrenal pero no afecta más allá de la fascia de Gerota.
T3b	Tumor que se extiende a la Vena Cava infra-diafragmática.
T3c	Tumor que se extiende en la vana cava supra-diafragmática o invade la pared de la vena Cava.
T4	Tumor que invade más allá de la fascia de Gerota (incluye la extensión a la suprarrenal ipsilateral)
Ganglios linfáticos regionales (Estadio N)	
Categoría N	Criterio N
Nx	Se desconoce la afectación de los ganglios linfáticos regionales.
N0	No afectación de los ganglios linfáticos regionales
N1	Metástasis en los ganglios linfáticos regionales
Metástasis a distancia (Estadio M)	
Categoría M	Criterio M
M0	No metástasis a distancia
M1	Metástasis a distancia

Tabla 2. Estadios TNM.⁽¹³⁾

ESTADIOS PRONÓSTICOS TNM			
ESTADIO	T	N	M
I	T1	N0	M0
II	T2	N0	M0
III	T3	Cualquier N	M0
	T1-2	N1	M0
IV	T4	Cualquier N	M0
	Cualquier T	Cualquier N	M1

En el seguimiento post-nefrectomía, hasta el 20-30% de los pacientes desarrollan recidiva local o sistémica.⁽¹⁵⁾

De cara a establecer el pronóstico de cada paciente, la literatura⁽⁷⁾ plantea individualizarlo en función de diversos factores:

- Factores clínicos: edad, sexo, obesidad, presencia de Diabetes Mellitus, presentación clínica.
- Factores patológicos: estadio TNM, subtipo histológico, grado Fuhman, presencia de necrosis, diferenciación sarcomatoide (que aumenta el riesgo de metástasis al diagnóstico), invasión microvascular y multifocalidad.
- Factores biológicos: hipercalcemia, neutrofilia, trombocitosis, niveles de proteína C reactiva, etc.
- Factores moleculares: como el gen *VHL* (factor molecular más estudiado en CCR) que se asocia con CCR de carácter hereditario. Otros factores moleculares estudiados son: la expresión de diversas proteínas como la anhidrasa carbónica IX (CaIX), el factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF), el factor inducible por la hipoxia (HIF), Ki67 (proliferación), TP53 y PTEN (homólogo de la fosfatasa y tensina), cadherina E y CD44 (adherencia celular).⁽¹⁷⁾ Ninguna de ellas ha demostrado mejorar la capacidad predictiva de los sistemas actuales, no siendo recomendados actualmente para la práctica clínica diaria.

Como herramienta para establecer el pronóstico de cada paciente se emplean actualmente nomogramas pronósticos, que aglutinan algunos de los factores comentados

(biológicos, clínicos y/o patológicos). Los más utilizados⁽¹⁸⁾ en la práctica e investigación clínicas son los nomogramas de Karakiewicz (supervivencia cáncer específica en pacientes con enfermedad localizada) y de Heng (que analiza factores pronósticos en pacientes metastásicos). El nomograma de Karakiewicz⁽¹⁹⁾ incluye en su formulario características del tumor como clasificación TNM, tamaño tumoral, grado de Fuhrman, subtipo histológico y características del paciente como la edad, el sexo y la presencia de síntomas (así como si éstos son locales o sistémicos). Por su parte, el nomograma de Heng⁽²⁰⁾ incluye como variables: el tiempo (menos de 1 año) entre el diagnóstico y la aplicación del tratamiento sistémico, el estado general del paciente (según la clasificación de Karnofsky), y valores de laboratorio como las cifras de hemoglobina, calcio, neutrófilos y plaquetas.

El tratamiento estándar del CCR es la nefrectomía, bien radical o parcial. Según el estadio tumoral, tamaño y localización de la lesión a nivel renal, así como en función de los antecedentes del paciente (insuficiencia renal, monorreno o enfermedad renal contralateral, o síndromes con predisposición genética a tumores renales múltiples como la enfermedad de Von Hippel Lindau, etc.) se puede apostar por una cirugía parcial, de cara a preservar la mayor cantidad de nefronas con garantías quirúrgicas y oncológicas.

Las vías de abordaje para el tratamiento radical pueden ser las clásicas descritas en la cirugía abierta, mediante lumbotomía, subcostal (uni- o bilateral), o toracoabdominal, indicadas en grandes masas renales con compromiso de estructuras adyacentes, adenopatías locorregionales y afectación tumoral de la vena cava. La elección del abordaje dependerá de la localización y tamaño del tumor, así como de su relación con estructuras anexas. En la cirugía del CCR puede ser necesaria la exéresis de estructuras adyacentes, como bazo, cola de páncreas, fragmentos intestinales, trombectomías de vena cava, todo ello por afectación tumoral.

En los últimos años la cirugía mínimamente invasiva (vía laparoscópica) ha desarrollado un interés creciente, derivado de la mejor recuperación de los pacientes y una baja tasa de complicaciones quirúrgicas, aportando otras muchas ventajas sobre la vía clásica, que ha hecho que esta técnica se realice de rutina en la mayoría de los servicios de urología. El abordaje robótico se ha descrito en la literatura,⁽²¹⁾ si bien los costes de este tipo de cirugía y la gran experiencia adquirida con la laparoscopia y sus buenos resultados, han frenado el desarrollo de la nefrectomía robótica, que queda reducida a centros y pacientes seleccionados.

La nefrectomía, ya sea por vía radical o parcial, abierta, laparoscópica o robótica, ofrece, en la mayoría de los casos de enfermedad localizada, unas elevadas posibilidades de curación. En estadios avanzados, la nefrectomía se plantea como tratamiento coadyuvante a otros tratamientos sistémicos.⁽¹⁾

Existen alternativas a la cirugía en el tratamiento del CCR,⁽¹⁾ si bien éstas se emplean en casos muy seleccionados. Entre las opciones disponibles encontramos:

- Vigilancia estrecha inicial de masas renales pequeñas, con posterior tratamiento en caso de progresión.
- Abordajes percutáneos, como:
 - Ablación por radiofrecuencia.
 - Crioablación y ablación por micro-ondas.
 - Ablación por láser.
 - Ablación con ultrasonidos centrados de alta intensidad (UCAI).

Estos abordajes percutáneos aportan ventajas como menor morbilidad, ausencia de ingreso hospitalario y la posibilidad de tratar a candidatos de alto riesgo quirúrgico (pacientes añosos, coagulopatías, etc.) Respecto a sus indicaciones son bastante restrictivas e incluyen:

- Lesiones corticales renales pequeñas en pacientes ancianos.
- Pacientes con predisposición genética a desarrollar tumores múltiples.
- Pacientes con tumores bilaterales.
- Pacientes con un solo riñón y un riesgo elevado de pérdida completa de la función renal tras la resección quirúrgica del tumor.

Estas técnicas estarían contraindicadas en lesiones mayores de 3cm, y en aquellas localizadas en la proximidad del hilio vásculo-renal o del uréter.

Respecto a la linfadenectomía no se recomienda de rutina, dado que no mejora la supervivencia, quedando relegada a la exéresis de ganglios palpables con fines de estadificación.⁽²²⁾

La respuesta del CCR a la radioterapia y quimioterapia es poco satisfactoria, por lo que su uso no se recomienda en la práctica diaria. Se ha defendido que la resistencia a quimioterápicos habituales como el 5-Fluorouracilo se debe a la alta expresión en CCR

de proteínas de resistencia farmacológica, como p-Glicoproteínas y MRP1.⁽²³⁾ Otros autores explican la quimiorresistencia en CCRcc en base a diferentes mecanismos moleculares, como la pérdida de la expresión de PTEN, fosfatasa que actúa como supresor tumoral al inhibir la expresión del gen *p53*, que es la diana terapéutica a la que se dirigen los quimioterápicos para inducir la apoptosis. En estos casos, la apoptosis no se puede inducir por el bloqueo del gen *p53*, lo que explicaría la quimiorresistencia según estos autores.⁽²⁴⁾

En fases metastásicas de la enfermedad puede realizarse una nefrectomía citorreductora además de metastasectomías en casos de metástasis únicas y accesibles y administrar tratamientos inmunoterápicos (interferón α e interleukina 2), inhibidores de la tirosin kinasa (sorafenib, sunitinib, pazopanib...), inhibidores de mTOR (temserolimus, everolimus) o anticuerpos monoclonales (bevacizumab), todos ellos en diversas líneas de tratamiento, si bien las tasas de respuesta de la enfermedad en estas fases son pobres.⁽¹⁷⁾

1.1.4 Origen del cáncer renal.

Respecto a su origen, histológicamente la mayoría de los autores coinciden en situarlo a nivel de epitelio tubular renal, hallazgo clásicamente descrito por Waldeyer en 1867⁽²⁵⁾, si bien esto depende del tipo histológico de CCR, ya que cada histología se origina de una parte diferente del túbulo renal, como ya se ha indicado previamente (Figura 2).

En los últimos años la biología molecular del CCR se ha convertido en uno de los pilares básicos para entender la génesis del cáncer renal y establecer posibles dianas terapéuticas. La identificación de los genes implicados en CCR se ha llevado a cabo a partir del estudio de síndromes del CCR hereditarios. Entre ellos, destaca el síndrome de Von Hippel Lindau, el de Birt-Hogg-Dube, síndrome de Reed y la esclerosis tuberosa, asociándose cada uno de ellos con diferentes formas histológicas de CCR de forma característica. Así, los genes Von Hippel Lindau (*vhl*), *polybromo 1* (*PBRM1*), el gen de la proteína asociada al gen *bcra* (BAP1) o el gen *setd2*, se presentan por algunos autores como facilitadores del CCR⁽²⁶⁾. El más estudiado de ellos es el síndrome de Von Hippel Lindau, que clínicamente se asocia con CCRcc además de hemangiomas en la retina y en

el sistema nervioso central (principalmente del cerebelo y la médula espinal), feocromocitoma, quistes del páncreas, riñón, hígado y epidídimo y tumores del saco endolinfático, entre otras muchas manifestaciones clínicas.⁽²⁷⁾ En este síndrome se producen mutaciones germinales en el gen *vhl*, situado en el brazo corto del cromosoma 3 (3p). Este gen codifica la proteína VHL (pVHL), que se une a otras proteínas (Elonguinas-a y -b, Cul2, etc.) para formar el complejo supresor tumoral de VHL. Este complejo supresor cataliza la ubiquitización del factor inducible por hipoxia alfa (HIF-alfa). HIF es un factor de transcripción que actúa como mediador de la hipoxia celular, tiene 2 subunidades: HIF-alfa, cuya concentración es dependiente de oxígeno y HIF-Beta, independiente de oxígeno. La interacción de ambas subunidades permite la regulación de la homeostasis del oxígeno en la célula, regulando la expresión de diferentes genes implicados en el metabolismo celular (GLUT-1), la angiogénesis (VEGF), la eritropoyesis, la apoptosis y la proliferación celular (bcl-2, p27), mecanismos todos ellos implicados en el desarrollo del CCR. En condiciones de aporte adecuado de oxígeno HIF-alfa se une al complejo supresor VHL, lo que deriva en su degradación por el proteosoma. Por el contrario, en condiciones de hipoxia, HIF-alfa se une a HIF-beta, formando un heterodímero que actúa como factor de transcripción de diferentes genes implicados en angiogénesis y proliferación celular, generando una cascada de señalización intracelular que desencadena la activación de otros genes relacionados con la pérdida de control de la proliferación celular y la evasión de la apoptosis⁽¹⁷⁾ (Figura 4).

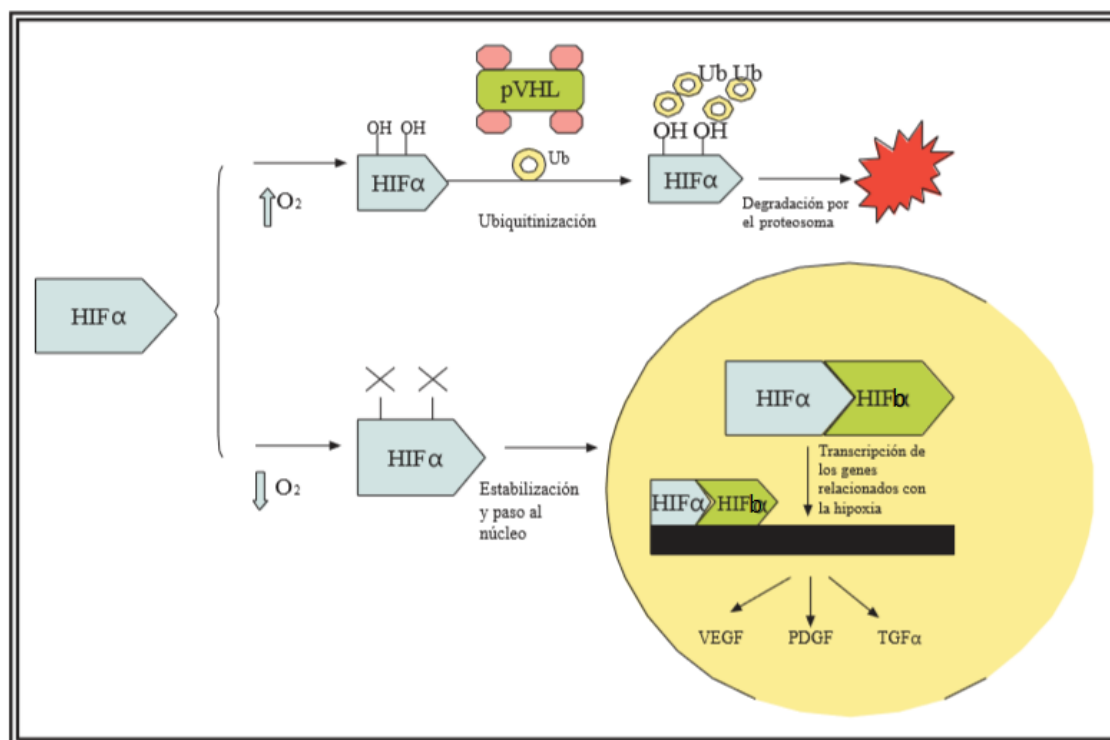


Figura 4. Esquema de HIF. Normo- e hipoxia (donde HIFα -flecha azul- se une a HIFβ-flecha verde).⁽¹⁹⁾

Otro hallazgo relevante respecto a la biología molecular del CCRcc, es la actividad de la Anhidrasa Carbónica IX (CAIX), que está regulada por HIF y por la inactivación de VHL, y cuya actividad se relaciona con la acidificación del medio extracelular y la supervivencia de los clones celulares en condiciones de hipoxia.⁽²⁸⁾ Igualmente, VEGF, también regulado por HIF, se sobreexpresa en la mayoría de los CCR y tiene especial relevancia en la progresión tumoral.⁽¹⁷⁾

Por tanto, la génesis del CCR tiene una importante base molecular y genética, siendo varios los mecanismos por los cuales el CCR puede evitar el control sobre el ciclo celular y desarrollarse. Además, estas vías moleculares se utilizan como dianas terapéuticas, constituyendo la base actual del tratamiento médico del CCR en estadios avanzados.

1.1.5 Marcadores tumorales.

Existen diversidad de marcadores en varios tipos de tumores que permiten su diagnóstico previo a la aparición de síntomas en el paciente. Estas herramientas favorecen un diagnóstico en estadios tempranos de la enfermedad, minimizando los casos con

afectación ganglionar y metastásica a distancia, y permitiendo la detección de la enfermedad en situaciones de mejor pronóstico. Son muchos los tumores que expresan sustancias susceptibles de ser detectadas en sangre mediante métodos poco invasivos, tales como el cáncer de próstata (PSA), el cáncer de ovario (CA-125) o el cáncer de colon (Antígeno Carcinoembrionario y CA 19.9). Actualmente no existe un marcador tumoral ni de diagnóstico precoz definido para el CCR, siendo el diagnóstico más habitual de tipo incidental, como se ha comentado anteriormente. La posibilidad de contar con un marcador tumoral fiable en cáncer renal sería fundamental para categorizar y tratar adecuadamente una masa renal, permitiría aumentar los diagnósticos de CCR en estadios más tempranos y favorecer un tratamiento precoz que se asociara a mejorías importantes en el pronóstico de esta enfermedad.

Un biomarcador debe ser una herramienta diagnóstica objetiva y cuantificable. Preferiblemente deben ser procedimientos no invasivos y es recomendable que sean estudiados de forma prospectiva previo a su uso clínico.⁽²⁹⁾ En CCR se han analizado diversos biomarcadores: de imagen (PET-TC, RMN), séricos (en relación con la respuesta a diversos tratamientos- VEGF, IFN-alfa, IL-6- y aquellos usados en los nomogramas pronósticos), urinarios (poco estudiados) y tisulares (inmunohistoquímica y marcadores moleculares y genéticos).

Históricamente la biopsia de tejido tumoral ha sido el “*gold standard*” para el diagnóstico en oncología, aportando información histológica sobre la malignidad de una lesión, además de ser una fuente de información genética. Este abordaje cuenta con diversos inconvenientes, entre los que destacan: la invasividad de la técnica, la necesidad de procedimientos anestésicos complementarios (con riesgos añadidos a la prueba), las complicaciones inherentes a la biopsia y la focalización de la toma de muestra en un punto concreto de la lesión, que podría limitar la interpretación de los resultados.⁽³⁰⁾ Estas limitaciones junto con el creciente interés de los hallazgos sobre los ácidos nucleicos libres en plasma, son los pilares en los que se apoya el desarrollo de la biopsia líquida, que aparece como una alternativa válida al analizar, en diferentes líquidos biológicos, biomarcadores derivados del tumor como son los CTCs y los ácidos nucleicos libres. Esta técnica posibilita la toma de muestras repetidas, poco invasivas y reproducibles en el tiempo, lo que facilitaría el control en la evolución y progresión de la enfermedad en contraposición a la imagen estática de una biopsia de tejido, con todas sus limitaciones.⁽³¹⁾ Por medio del análisis sanguíneo podemos determinar la presencia de CTCs, aunque son

difíciles de obtener por su escasez en sangre periférica y por su morfología heterogénea. Igualmente, se puede determinar cfNA, que es muy abundante en sangre, por lo que su determinación es más sencilla, además el análisis del cfNA nos permite detectar en plasma mutaciones asociadas al tumor⁽³²⁾, y al proceder estos cfNA de diferentes regiones del tumor representan de una forma más global su heterogeneidad, a diferencia de una muestra aislada de biopsia de tejido.

La eficacia de estas técnicas se ha demostrado en cáncer de mama, páncreas y colon⁽³³⁾, entre otros. En el cáncer de mama, entidad de gran heterogeneidad y con importante variabilidad inter e intratumoral, se ha defendido especialmente el uso de esta técnica no invasiva ante la necesidad de buscar tratamientos individualizados, siendo el análisis de los ácidos nucleicos circulantes en plasma un gran aliado en este sentido. Así, el estudio del ADN libre tumoral se ha comunicado en cáncer de mama como una herramienta que aporta información tumoral molecular específica, lo que ha permitido diseñar tratamientos a medida de cada tumor mamario y detectar de forma precoz tanto la enfermedad residual en sus fases incipientes, como la aparición de resistencias a fármacos.^(30, 32)

Otra entidad donde la biopsia líquida ha sido ampliamente estudiada es el carcinoma colorrectal, en el que se ha detectado el desarrollo de poblaciones subclonales heterogéneas de células tumorales que llevan al desarrollo de resistencias farmacológicas secundarias y que pueden detectarse mediante biopsia líquida.⁽³⁴⁾ Varios autores destacan el papel de la biopsia líquida como técnica no invasiva en carcinoma colorrectal, que permite adquirir información sobre el estado y la diseminación del tumor, monitorizar la respuesta a tratamientos complementarios como la quimioterapia y detectar posibles recurrencias.^{(30, 32),(34)} En esta patología se ha demostrado la presencia de fragmentos de ADN liberados por el tumor a la circulación, que tienen potencial uso como biomarcador, ya que permiten detectar y confirmar la presencia de enfermedad en estadios relativamente precoces.⁽³⁴⁾

Como ya se ha comentado, en el CCR actualmente no existen marcadores adecuados, por lo que sería muy interesante disponer de una herramienta que permitiera la detección precoz y la monitorización tras el tratamiento de esta enfermedad.

1.2 ÁCIDOS NUCLEICOS CIRCULANTES EN PLASMA Y CÁNCER

1.2.1 Primeros estudios.

El estudio de los ácidos nucleicos circulantes se inicia con los trabajos de *Mandel* y *Métais*, en 1940, cuando publican la presencia de estas moléculas en plasma humano. Usando técnicas cuantitativas, estos autores detectaron ADN y ARN libres circulantes (*cell-free* ADN o cfDNA y *cell-free* ARN o cfRNA) en el plasma de sujetos sanos y enfermos.⁽³⁵⁾ Sin embargo, su estudio tuvo escasa repercusión hasta 1966, en que *Tan y cols.*, demostraron la presencia de ADN en el suero y plasma de pacientes afectados de lupus eritematoso sistémico (LES).⁽³⁶⁾ Más tarde *Leon y cols.* en 1977, detectaron niveles de ADN más altos en el suero de pacientes con enfermedad neoplásica que en sujetos sanos.⁽³⁷⁾ Los niveles de ADN fueron cuantificados usando técnicas de inmunoensayo, basadas en anticuerpos anti-ADN obtenidos de pacientes con LES. Comparados con controles sanos, el 50% de los pacientes con cáncer presentaban niveles elevados de ADN. Estos niveles disminuían más del 90% cuando los pacientes respondían a la radioterapia, mientras que niveles persistentemente altos después del tratamiento se asociaban con peor pronóstico.⁽³⁸⁾ En 1989, *Stroun y cols.* sugirieron que, al menos parte del ADN circulante en el suero o plasma, derivaba del tumor primario,⁽³⁹⁾ pero esta hipótesis no fue confirmada hasta más tarde, cuando se describieron mutaciones del gen *KRAS* en plasma de pacientes con neoplasias de páncreas y leucemia mieloide aguda,⁽⁴⁰⁾ lo que ponía de manifiesto la presencia de ácidos nucleicos específicos del tumor en la circulación periférica. Los principales hallazgos de estas referencias bibliográficas se resumen en la Tabla 3.

Posteriormente los estudios moleculares han mostrado evidencias de que las alteraciones genéticas detectadas en el ADN plasmático o sérico son las mismas que están presentes en el tumor: mutaciones en oncogenes, amplificación de oncogenes, inestabilidad de microsatélites, translocaciones cromosómicas, alteraciones epigenéticas (ej. metilación aberrante) o incluso ADN vírico,⁽⁴²⁾ apoyando la idea del origen tumoral del cfADN y la posibilidad de usar las técnicas moleculares en su caracterización.

Tabla 3. Cronología bibliográfica sobre el origen de los ácidos nucleicos en plasma.

PRIMER AUTOR	AÑO	APORTE
<i>Mandel y Metàis</i>	1940	Presencia de ácidos nucleicos circulantes en plasma humano.
<i>Tan</i>	1966	Presencia de ADN en suero y plasma en pacientes con LES.
<i>Leon</i>	1977	Niveles de ADN plasmático más elevados en pacientes neoplásicos, que disminuyen con radioterapia y si no lo hacen evolucionan peor.
<i>Stroun</i>	1989	Parte del ADN circulante deriva del tumor primario.
<i>Theodor</i>	1999	Presencia de ácidos nucleicos específicos del tumor en circulación periférica (mutaciones <i>KRAS</i> en plasma de pacientes con neo de páncreas).

1.2.2 Valor clínico del ADN y ARN libres circulantes.

Varios mecanismos han sido sugeridos para explicar la presencia de ADN a nivel extracelular, entre ellos destacan la necrosis tumoral, la apoptosis, la lisis de células cancerosas y la liberación espontánea por alteraciones de la homeostasis celular.⁽⁴²⁾ En este sentido, Hauser y cols. defienden la existencia de diferentes patrones de fragmentación de ADN, derivado de los diferentes mecanismos de muerte celular, así, las moléculas de mayor tamaño (> 10.000 pares de bases) derivarían de procesos de necrosis mientras que moléculas más pequeñas (< 200 pares de bases) procederían de mecanismos de apoptosis celular.⁽⁴³⁾ Estos mismos autores también defienden que el cfDNA es un instrumento fácilmente medible, destacando la estabilidad de sus fragmentos, por lo que presentan su análisis como un instrumento rápido, no invasivo y sensible en la enfermedad tumoral

El papel del ARN circulante (cfARN) ha sido menos estudiado en la literatura, si bien algunos autores han defendido su potencial como biomarcador para diferentes enfermedades, entre ellas el cáncer.⁽⁴⁴⁾ Se ha documentado su presencia a nivel extracelular, siendo, al igual que el ADN, fácilmente extraíbles mediante muestra sanguínea, plasma, orina y demás líquidos corporales. Los mecanismos que parecen explicar la presencia de ARN circulante son la apoptosis y la necrosis tumoral.

Existen diferentes formas de cfARN en plasma, tales como ARN mensajero (ARNm), microARN (miRNA) y ARN circular (circRNA). Cada subtipo de ARN tiene sus características propias de estabilidad y fragmentación, siendo su procesamiento más o menos complejo, en función de éstas.⁽⁴⁵⁾ El más abundante y estable es miRNA, por lo que ha sido el subtipo más estudiado en los últimos años.

El ARNm aparece muy fragmentado y en escasa cantidad, lo que se traduce en una difícil detección del mismo en plasma. No obstante, ya en 1999⁽⁴⁶⁾ se determinó la presencia de niveles aumentados de ARNm extracelular en el plasma de pacientes oncológicos, indicando un posible papel de cfARNm en el diagnóstico y monitorización del cáncer.

Por todo lo expuesto, y dado que tanto ADN como ARN se pueden determinar a nivel extracelular y que ambos tienen una utilidad potencial en el diagnóstico y seguimiento no invasivo de diferentes patologías, incluida la enfermedad tumoral, son varios los autores^(45, 47) que defienden la denominación común de “*ácidos nucleicos circulantes*” (*cell-free NA*), agrupando bajo el mismo término el análisis de cfADN y cfARN, con el objetivo de emplearlos en la aplicación de biopsia líquida.

Por otra parte, diversos grupos han defendido el papel de los ácidos nucleicos circulantes en el desarrollo de metástasis, actuando como conductores o “*drivers*” metastásicos. La presencia de este cfADN en el torrente circulatorio ha sido considerada por diferentes autores como la base de la teoría de la Genometástasis, que defiende la transferencia de oncogenes de células tumorales a otras células de órganos diana a distancia, planteando un papel dinámico de los cfADN en el desarrollo metastásico (Figura 5).^(31, 47, 48) Este cfADN puede proceder bien de procesos pasivos como necrosis y apoptosis celular, ya comentados previamente, o por mecanismos de liberación activa a partir de células vivas, en forma de exosomas, microvesículas, virtosomas o incluso puede presentarse cfADN adherido a la superficie celular en plasma.⁽³¹⁾

En resumen, el análisis del cfDNA puede proporcionar una mejor representación del paciente con cáncer en su conjunto, al aportar información sobre todas las subpoblaciones celulares tanto del tumor primario como del tumor metastásico.⁽⁴⁹⁾

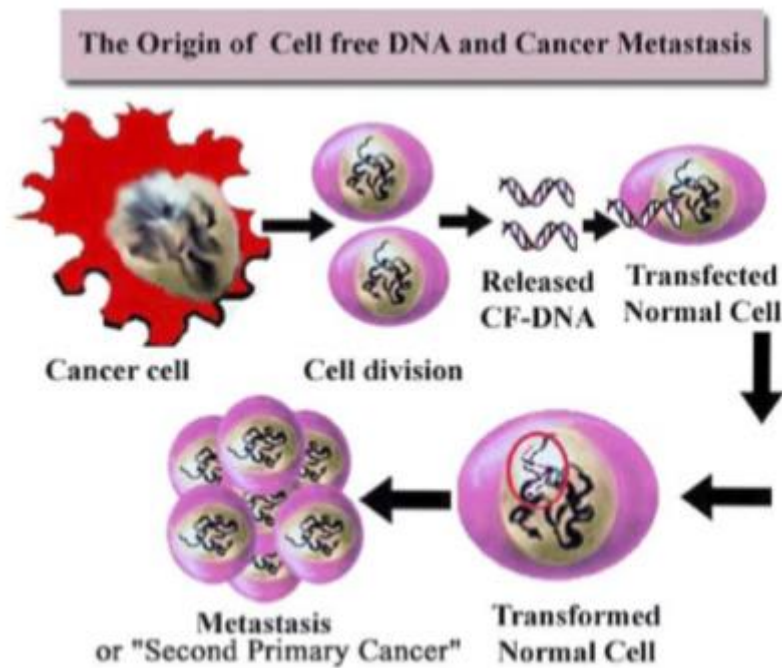


Figura 5.- Teoría del origen del ADN libre circulante y las metástasis en el cáncer. La división de las células cancerosas produciría una liberación de cfADN en los fluidos corporales, con capacidad de transferirse a las células adyacentes o remotas. Estas células transformadas mantendrían la capacidad de proliferación, dando lugar a metástasis o aparición de un segundo tumor primario.⁽⁴⁶⁾

Sin embargo, la presencia de ADN circulante no es exclusiva de patologías oncológicas. De este modo, en personas sanas el origen de ADN extracelular ha sido relacionado fundamentalmente con células hematopoyéticas, en especial con los linfocitos. Igualmente, la presencia de ADN circulante en forma de nucleosomas en sanos, en pacientes con diferentes enfermedades autoinmunes como Lupus Eritematoso Sistémico y en pacientes con tumores de diversas estirpes ha sido comunicada por diferentes autores.⁽⁴⁹⁻⁵¹⁾ También se ha determinado la presencia de ADN del feto en sangre materna y ADN extracelular del órgano donado en la sangre de pacientes que recibieron un trasplante,^(52, 53) dando estas determinaciones una idea de la variedad de situaciones clínicas en las que está presente el cfDNA, al que se le presupone un importante papel en el diagnóstico, pronóstico y monitorización de las referidas situaciones clínicas.

1.3 CÁNCER Y TELOMERASA. GENERALIDADES

Los telómeros son estructuras especializadas localizadas en los extremos de los cromosomas, ricas en guanina, que juegan un papel crítico en la estabilidad, replicación y función de los cromosomas, impidiendo la recombinación de éstos o la fusión en los extremos (Figura 6). Aunque las secuencias varían entre especies, los telómeros son muy similares en los eucariotas. En los humanos y otros vertebrados están formados por varias kilobases de la repetición de la secuencia -TTAGGG, las cuales están repetidas entre 150 y 2000 veces. Análisis cromosómicos han mostrado que los telómeros pierden más de 200 kilobases de ADN por cada división celular *in vitro* e *in vivo*, relacionándose el acortamiento cromosómico con el envejecimiento y la muerte celular. Los telómeros se presentan como reguladores esenciales del ciclo celular y de la integridad de los cromosomas.⁽⁵⁴⁾ En este proceso de regulación del ciclo celular por parte del telómero se alcanza un punto en el que la síntesis de ADN al final del cromosoma no puede ser completada, ocasionando esta situación un acortamiento progresivo de las repeticiones teloméricas, que desencadena un ciclo de división, fenómeno conocido como “*problema del fin de replicación*”, por lo que una vez que el telómero se ha acortado hasta una longitud crítica, la célula inicia la senescencia replicativa⁽⁵⁴⁾, que implica la apoptosis celular. Para conseguir una proliferación celular ilimitada y mantener la estabilidad genómica, la célula necesita compensar este fenómeno de fin de replicación, lo que puede hacer mediante 2 mecanismos: la activación de la enzima telomerasa o mediante el mecanismo alternativo de alargamiento del telómero (*Alternative Lengthening of telomerase* -ALT).⁽⁵⁵⁾

La telomerasa fue descrita por Greider y Blackburn en 1985,⁽⁵⁶⁾ descubrimiento reconocido con el Premio Nobel en Medicina en 2009, y su función es la síntesis de hexámeros -TTAGGG de ADN en el extremo de los cromosomas. Está formado por 3 subunidades mayores:⁽⁵⁴⁾

- 1.- la subunidad hTR (*human telomerase RNA* en la literatura anglosajona), aporta la plantilla de ARN para la síntesis de las secuencias repetidas de ADN telomérico.
- 2.- El componente más importante de la actividad enzimática es la transcriptasa inversa humana hTERT (*human telomerase reverse transcriptase*), que permite la síntesis de ADN a partir del ARN contenido en la subunidad hTR.
- 3.- El tercer componente está formado por las proteínas asociadas a la telomerasa: disquerina/NAP57, y proteínas humanas GAR1, NOP10 y NHP2.



Figura 6.- Imagen de microscopía óptica de un cromosoma con detalle de los telómeros en sus extremos (amarillo).⁽⁵⁷⁾

Así, la telomerasa realiza la síntesis de hexámeros a partir de un molde de ARN, mediante su actividad reverso-transcriptasa, transportando su propio molde de ARN, que es complementario de las secuencias repetidas del telómero, que forma parte del complejo enzimático, constituido por la región del molde del ARN, y por la subunidad proteica que dispone la actividad catalítica enzimática. El uso de este ARN como molde permite a la telomerasa generar múltiples copias de las secuencias teloméricas repetidas, lo que permite mantener los telómeros en ausencia de un molde convencional de ADN que dirija esta síntesis.

Se ha presentado a la telomerasa como una enzima con la capacidad de perpetuar el ciclo replicativo y la proliferación ilimitada de subtipos celulares en los que se encuentra activa, entre ellos de células tumorales, derivado de su capacidad para mantener la estructura del telómero. De este modo se considera crítica en el crecimiento tumoral y su progresión, otorgándole un importante papel como mecanismo fundamental en la carcinogénesis.⁽⁵⁸⁾

El otro mecanismo propuesto para explicar la replicación celular ilimitada en aquellos tejidos que no muestran actividad telomerasa es el “*mecanismo alternativo para alargar el telómero*” (ALT). Según Dunham y cols,⁽⁵⁹⁾ la vía ALT implica un mecanismo de recombinación y las características de las células que optan por esta vía incluyen telómeros heterogéneos y largos.

1.3.1 Actividad telomerasa en tumores.

El mantenimiento del telómero es un importante mecanismo mediante el que las células tumorales evitan la senescencia celular y en él se implica la reactivación y sobre-regulación de la actividad telomerasa. Se ha determinado actividad de la telomerasa en el 80-90% de los tumores humanos y se ha comprobado su activación en lesiones premalignas.⁽⁵⁴⁾ La expresión de la telomerasa es prácticamente indetectable en los tejidos no tumorales, exceptuando ciertas células, como células madre, linfocitos, células germinales, mucosa oral o endometrio en la fase proliferativa del ciclo menstrual.⁽⁶⁰⁾

El primer tejido tumoral en el que se describió la actividad telomerasa fue en el carcinoma de ovario y posteriormente se ha comunicado su actividad también en cáncer gástrico, hepático, renal y pancreático, entre otros.⁽⁶¹⁾ En la mayoría de las células cancerosas ocurre un acortamiento considerable de los telómeros antes de la re-expresión de la telomerasa y en esta situación, en la que gran número de células se han convertido en inmortales, la longitud del telómero parece depender de un equilibrio entre la pérdida de repeticiones teloméricas en cada ciclo de replicación del ADN y la síntesis de repeticiones teloméricas mediadas por la actividad telomerasa.⁽⁶²⁾ Sin embargo, la telomerasa por sí misma no es oncogénica, como se ha mostrado en un estudio, en el que las líneas celulares a las que se transfirió el gen *hTERT* no mostraron transformación maligna durante un largo periodo de tiempo.⁽⁶³⁾

Es muy interesante discriminar qué tumores expresan telomerasa de forma precoz y cuales no la expresan o lo hacen débilmente, de cara a plantear su determinación como herramienta de diagnóstico precoz, pronóstico y de seguimiento clínico. Se ha estudiado que todas las células expresan la subunidad hTR, independientemente de si hay o no expresión de telomerasa. Sin embargo, la expresión de hTERT se correlaciona con la actividad telomerasa porque su presencia es esencial para la actividad enzimática, de ahí

que la determinación de hTERT ARNm se considere un marcador más fiable para la detección de células tumorales en muestras clínicas.⁽⁶²⁾

No son muchas las referencias en el campo de la urología en este sentido, si bien publicaciones actuales hacen referencia a esta subunidad de la telomerasa como marcador diagnóstico y pronóstico. En esta línea, encontramos el trabajo de March-Villalba y cols.⁽⁶⁴⁾, donde analizan el uso de la determinación de hTERT ARNm en orina como herramienta diagnóstica en cáncer de vejiga comparándola con la citología de orina y otros test de diagnóstico molecular en orina, concluyendo que esta determinación tiene un mayor rendimiento diagnóstico en comparación con la citología y el NMP22 test. Otros tumores en los que se ha estudiado en profundidad el análisis de hTERT ARNm en plasma es el cáncer de laringe e hipofaringe, donde Contreras y cols.⁽⁶⁵⁾ concluyen que la expresión de este marcador está aumentada en tejido tumoral de laringe en comparación con tejidos sanos y que su expresión en el plasma de pacientes de cáncer laríngeo es cuantificable, no siendo así en el plasma de controles sanos y, además, esta expresión tiene valor pronóstico, ya que se relaciona con el riesgo de desarrollar metástasis y recidivas posteriores.

2. JUSTIFICACIÓN. OBJETIVOS E HIPÓTESIS

2.1. JUSTIFICACIÓN

La prevalencia del CCR ha ido en aumento en los últimos años en gran parte debido al incremento de su diagnóstico incidental derivado de la mayor accesibilidad a las pruebas de imagen y a la mejora en la precisión de éstas.⁽⁵⁾ En relación a la trascendencia en la epidemiología del CCR, cabe destacar que esta incidentalidad de la enfermedad, ha reducido la edad de diagnóstico en los pacientes, afectando con más frecuencia a población activa y a pacientes muy jóvenes con una esperanza de vida más larga que la referida en series históricas.

Clínicamente el CCR es una entidad de gran importancia, ya que su tratamiento ha variado poco en el tiempo, reduciéndose a la nefrectomía en casos localizados y a tratamientos sistémicos, con resultados poco alentadores en los casos con afectación metastásica. En este sentido, recientemente los resultados con los nuevos quimioterápicos e inmunoterápicos proporcionan resultados alentadores en pacientes metastásicos al poder establecer tratamientos dirigidos dependiendo de las características biológicas del tumor.

El CCR se presenta como un tumor biológicamente heterogéneo, sin características claramente definidas y muy variables incluso dentro de la misma estirpe histológica. Esta propiedad dificulta el poder establecer marcadores diagnósticos propios, lo que hace que hoy día se sigan utilizando marcadores clínicos y patológicos que vienen recogidos en diversos nomogramas, como los de Karakiewicz y Heng, los cuales son hoy día claramente insuficientes en la evaluación pronóstica de cada paciente^(19, 20). Esta heterogeneidad molecular del CCR le condiciona unas propiedades conocidas en relación a su quimio y radio-resistencia.^(23, 66)

El desarrollo actual de la biología molecular en el CCR, ha aportado algo de luz en la carcinogénesis del tumor renal y, como se ha comentado anteriormente, ha facilitado el poder establecer tratamientos sistémicos dirigidos.

Por otro lado, actualmente existe un interés creciente en el empleo de la biopsia líquida, y en concreto, en la posible utilidad de los ácidos nucleicos circulantes en plasma, una vez comprobado la dificultad del empleo de las células tumorales circulantes. La determinación de cfNA en determinadas patologías como el cáncer de mama y el cáncer

colorrectal, las cuales comparten con el CCR una importante heterogeneidad inter e intratumoral, ha reforzado su papel como un instrumento de diagnóstico precoz, una herramienta de seguimiento clínico post-tratamiento y un predictor de recurrencias, e incluso, detector de resistencias a determinados fármacos.^(30, 33, 67)

La falta de marcadores séricos para el CCR, junto a las dificultades de las biopsias tisulares, que presentan, por otra parte, un bajo rendimiento, hace necesaria la búsqueda de alternativas para la determinación de marcadores diagnósticos y pronósticos en este tumor. En este sentido, la biopsia líquida puede tener un papel relevante y, ante la falta de estudios con series amplias sobre su uso y utilidad en el CCR, nos hemos planteado las siguientes hipótesis y objetivos.

2.2. OBJETIVOS:

2.2.1 Objetivo general.

Evaluar la utilidad clínica de la detección y cuantificación de ADN y ARNm en plasma de pacientes con cáncer de células renales.

2.2.2 Objetivos específicos.

- 1.- Evaluar la utilidad clínica y pronóstica de la expresión del gen que codifica la telomerasa humana en tejido tumoral y plasma.
- 2.- Evaluar la utilidad de la cuantificación de ADN y de ARNm (hTERT y GAPDH) en plasma como herramienta diagnóstica del cáncer de células renales.
- 3.- Analizar la correlación entre los niveles de ADN y ARNm plasmáticos y las características clínico-patológicas del tumor.
- 4.- Analizar la correlación entre los niveles de ADN y ARNm plasmáticos y la evolución clínica tras el tratamiento y seguimiento a largo plazo.

2.3 HIPÓTESIS:

2.3.1 Hipótesis conceptual

El desarrollo y progresión del carcinoma de células renales se asocia con un aumento de los niveles de ADN y de ARNm libres en plasma, por lo que la determinación de estos niveles es de utilidad clínica en el diagnóstico, pronóstico y seguimiento post-terapéutico de estos pacientes. Igualmente, la expresión de hTERT ARNm en tejido tumoral es mayor que en muestras de tejido renal adyacente al tumor, por lo que el análisis de su expresión tiene valor diagnóstico y pronóstico en estos pacientes.

2.3.2 Hipótesis operativas

- 1.- En pacientes con carcinoma de células renales se detecta más ADN circulante en plasma que en sujetos sanos. Los niveles de este ADN permiten predecir recidiva y metastatización.
- 2.- En pacientes con carcinoma de células renales se detecta más ARNm de GAPDH y de hTERT circulante en plasma que en sujetos sanos. Los niveles de este ARN permiten predecir recidiva y metastatización.
- 3.- La expresión de hTERT ARNm de la telomerasa en tejido tumoral tiene valor diagnóstico y pronóstico.

2.3.3 Hipótesis estadísticas

- Hipótesis nula: no hay diferencias en los niveles de ADN y ARNm plasmático entre pacientes con carcinoma de células renales y sujetos sanos, ni entre pacientes con distinto estadio tumoral.

- Hipótesis alternativa: en los pacientes de carcinoma de células renales pueden detectarse niveles de ADN y ARNm plasmático significativamente mayores que en sujetos sanos. Los niveles de estos ácidos nucleicos disminuyen tras el tratamiento y se elevan de nuevo previamente al diagnóstico de recidivas y metástasis. Igualmente, la expresión de hTERT ARNm en tejido tumoral es significativamente mayor que en muestras de tejido renal adyacente al tumor.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. DISEÑO DEL ESTUDIO Y POBLACIÓN

Se trata de un estudio de cohortes prospectivo formado inicialmente por 120 pacientes diagnosticados de CCR y tratados quirúrgicamente en la Gerencia de Atención Integrada de Albacete según el protocolo internacional aceptado por las diferentes sociedades científicas urológicas. El periodo de recogida de datos comprendió desde el 23 de marzo de 2015 hasta el 6 de febrero de 2018. Tras descartar 9 pacientes por no presentar muestra de tejido válido por diferentes motivos, la muestra final del estudio fue de 111 muestras de tejido tumoral de CCR y 94 muestras de tejido adyacente sano.

Se utilizó un grupo control formado por 31 sujetos, en los que se comprobó la ausencia de cualquier antecedente de enfermedad oncológica. Este grupo se reclutó de forma consecutiva entre el 20 de junio de 2014 y el 9 de enero de 2015.

Para el análisis de los plasmas se utilizaron inicialmente muestras de 77 pacientes y 31 controles para la determinación de ARNm y 61 muestras y 22 controles para la determinación de ADN. El número total de muestras finalmente analizadas en cada uno de los momentos del estudio y de los marcadores plasmáticos utilizados se muestra en el Diagrama 1.

NÚMERO DE MUESTRAS DE PLASMA		
MARCADOR	PACIENTES	VOLUNTARIOS SANOS
<ul style="list-style-type: none"> • GAPDH ARNm • hTERT ARNm • hTERT ADN • GAPDH ADN • ADN MONODOSE® 	<ul style="list-style-type: none"> • 77 pre/77 post/ 55 anual • 21 de 77 • 61 pre/61 post/ 53 anual • 61 pre/61 post/ 54 anual • 54 Pre/54 post/ 50 anual 	<ul style="list-style-type: none"> • 31 • 31 • 22 • 22 • 22

Diagrama 1. Distribución de muestras según marcador plasmático analizado.

Pre: preoperatoria; **Post:** postoperatoria; **anual:** extraída un año tras el tratamiento.

3.1.1 Criterios de inclusión.

Se incluyeron todos los pacientes intervenidos de nefrectomía por CCR por el Servicio de Urología de la GAI de Albacete, con confirmación histológica posterior por parte del Servicio de Anatomía Patológica, en cualquiera de sus variantes, y que dieron su consentimiento por escrito. Se incluyeron igualmente los casos de oncocitomas, por su posible asociación con otras estirpes.

3.1.2 Criterios de exclusión.

Se rechazaron aquellos casos con histologías benignas o tumores de otra etiología (angiomilipomas, linfomas, tumores uroteliales, tumores retroperitoneales, etc.). Los casos en que los oncocitomas eran la única estirpe histológica fueron excluidos del estudio de los plasmas, no así del análisis de los tejidos. Igualmente, se excluyeron aquellos pacientes con presencia de alteraciones de la coagulación que impidieran el adecuado procesamiento de las muestras plasmáticas.

Además, todos los pacientes y voluntarios sanos incluidos en este estudio aceptaron libremente su participación, firmando el documento de Consentimiento Informado para donación de muestras biológicas para Biobanco y la autorización para procesar sus muestras de tejido y plasma en el laboratorio de la Unidad de Investigación de la GAI de Albacete. (Anexo I)

3.2 RECOGIDA DE DATOS

Se extrajeron muestras de sangre periférica en el preoperatorio, postoperatorio inmediato (3-5 días), y un año después de la intervención, junto con el análisis paralelo de muestras de tejido tumoral y tejido renal sano adyacente al tumor. Para ello, tras la inducción anestésica previa a la intervención quirúrgica, se extrajo de cada paciente la primera muestra de sangre, mediante punción en la vena cubital. Concretamente se obtuvieron 10 ml de sangre venosa que se depositaron en tubos con EDTA (*Vacurette*,

Greiner Bio-one[®], GmbH, Austria). Dichas muestras se procesaron inmediatamente para la obtención de plasma (Figura 7).

Tras la extirpación del tumor se remitió la pieza quirúrgica en fresco al Servicio de Anatomía Patológica, obteniéndose, en coordinación con el Biobanco de la GAI de Albacete, muestras representativas del tumor y de tejido renal sano adyacente al tumor. En el caso de que la técnica fuera nefrectomía parcial o tumorectomía, la muestra de tejido renal sano adyacente fue considerada por el patólogo a partir del borde quirúrgico sano, por lo que en algunos casos hubo muestra tumoral pero no muestra “sana”. Esto ocurrió en 17 casos, por tanto, se analizaron 94 muestras de tejido sano adyacente al tumor. Todas las muestras fueron registradas, asignándoles un número de entrada, anotando la fecha de recogida, nombre y apellidos del paciente y número de historia clínica. Una parte se colocaron en criomoldes de plástico embebidas en medio criosolidificable (*Tissue-Tek*[®]; Sakura Finetek Europe, Zoeterwoude, Holanda), y se congelaron con prontitud sumergiendo esos criomoldes en 2-metil-butano enfriado a -80°C. A continuación, se archivaron en los ultracongeladores a -80°C hasta el momento de su análisis. El resto de la pieza quirúrgica tumoral se procesó en el Servicio de Anatomía Patológica, siguiendo los protocolos habituales, para el estudio anatomopatológico estándar y la correcta identificación y estadificación del tumor.

Las muestras de plasma de los pacientes (preoperatorias, postoperatorias y anuales) junto a la única muestra del grupo control, fueron procesadas y analizadas en la Unidad de Investigación de la GAI de Albacete siguiendo el protocolo establecido.

En todos los pacientes se realizó una revisión inicial de su historia clínica, para determinar los aspectos socio-demográficos objeto de análisis, codificados como variables clínicas y patológicas en el siguiente apartado. Estas historias fueron revisadas nuevamente (tras la toma de la muestra al año de la nefrectomía) para valorar la evolución de los pacientes, analizando datos de progresión (clínica o radiológica) y la necesidad de tratamientos complementarios, tales como quimioterapia y radioterapia. También se evaluó la mortalidad en nuestra serie durante el periodo de análisis.

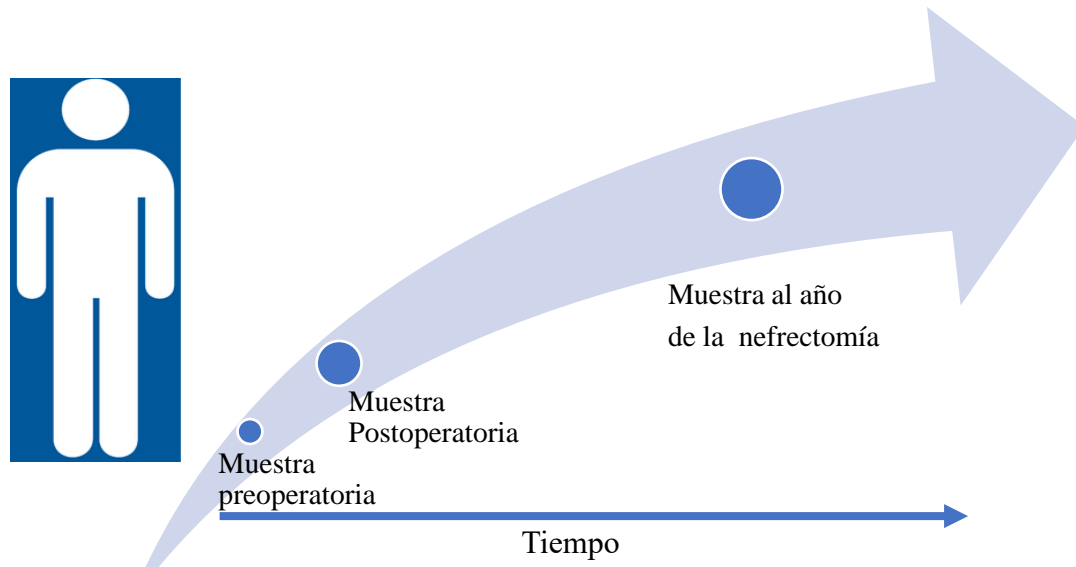


Figura 7. Diagrama del proceso de toma de muestras en un paciente tipo de la serie.

3.3. METODOLOGÍA DE LABORATORIO: PROCESAMIENTO DE LAS MUESTRAS BIOLÓGICAS

3.3.1 Procesamiento inicial de las muestras de sangre y aislamiento del plasma.

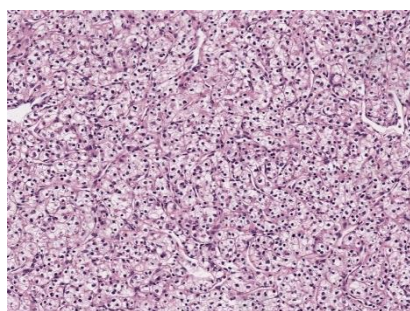
Todas las muestras sanguíneas fueron procesadas en la Unidad de Investigación de la GAI de Albacete. En el plazo máximo de tres horas tras la extracción, se sometieron a dos centrifugaciones. La primera durante 10' a 1.800 x g. Tras ella se recogió el plasma, con cuidado de no arrastrar el sedimento, y se sometió a una segunda centrifugación durante 10' a 3.000 x g. El plasma obtenido entonces fue el utilizado para los posteriores análisis. Las muestras de plasma se alicuotaron y conservaron a una temperatura de -80°C hasta el momento de su análisis.

3.3.2 Análisis de pieza tumoral

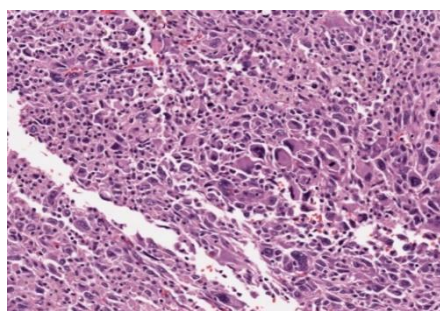
3.3.2a. Estudio histológico:

Todas las piezas de nefrectomía fueron remitidas al servicio de Anatomía Patológica de nuestro hospital para su análisis histológico e inmunohistoquímico según técnicas de rutina para confirmar el diagnóstico de CCR. Respecto a las muestras de tejido sano adyacente al tumor, todas ellas fueron igualmente valoradas por el patólogo, quien excluyó la presencia de tumor en las mismas. La Figura 8 muestra los hallazgos histológicos clásicos de los subtipos más frecuentes de CCR:⁽¹⁰⁾

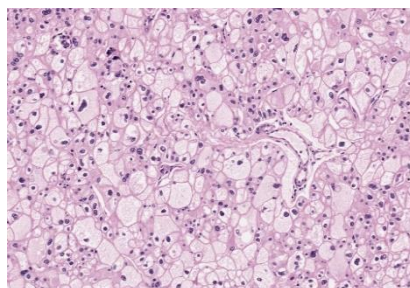
- 1.- CCR células claras: destaca la presencia de células de citoplasma claro secundario a su gran contenido en glucógeno y lípidos, que dan nombre a este subtipo de CCR.
- 2.- Diferenciación sarcomatoide: histológicamente se define por la presencia de células fusiformes, con invasión de la grasa y necrosis tumoral.
- 3.- CCR cromóforo: destaca un mayor tamaño celular, el aspecto poliédrico con buena delimitación de la membrana citoplasmática y el abundante citoplasma reticular pálido secundario a la presencia de vesículas que se tiñen con hierro coloidal (tinción de Hale).
- 4.- CCR papilar: distribución de sus células alrededor de ejes capilares (papilas) en el 50-70% de la lesión. El análisis de los tipos celulares que recubren estas papilas diferencia el CCR papilar tipo 1 (con predominio de células basófilas) del tipo 2 (con predominio de células eosinófilas).



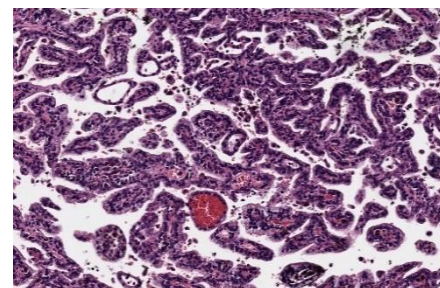
1.- CCR Células claras



2.- Diferenciación sarcomatoide



3.- CCR cromófobo



4.- CCR papilar

Figura 8.- Representación histológica de los diferentes subtipos histológicos de CCR.

3.3.2b. Extracción de ARN en pieza tumoral.

La extracción del ARN de las muestras de tumor y de tejidos sanos adyacentes corrió a cargo del Biobanco de nuestro Centro. En primer lugar, se realizaron cortes de 30 nm con un criostato, y seguidamente se utilizó el kit “*All Prep DNA/RNA Mini*” (Qiagen®, Hilden, Alemania), siguiendo las instrucciones del fabricante.

Para prevenir la contaminación con ADN en el ARN retenido, se realizó un tratamiento con la enzima ADNasa I con el “*DNase set*” (Qiagen®, Hilden, Alemania), según el protocolo recomendado. La ausencia de ADN se valoró mediante una PCR para detección de un fragmento de 249 pares de bases (pb) del gen beta-globina humana.

El ARN obtenido se valoró en concentración y pureza en el espectrofotómetro NanoDrop DN-100 (*NanoDrop Technologies, Inc*, Wilmington, EEUU) usando 2 µl. La integridad del ARN se estudió valorando la de los ARN ribosómicos 28S y 18S mediante electroforesis en gel de agarosa al 0.8% en búfer. Las muestras de ARN se congelaron y almacenaron a -80°C hasta su uso. Previa a la manipulación fue necesaria la transcripción del ARNm en ADN complementario (ADNc). Ésta se realizó con un kit comercial

“*Quantitect reverse transcription*” (Quiagen®). El ADNc se congeló a -20°C para estudios posteriores (Figura 9).

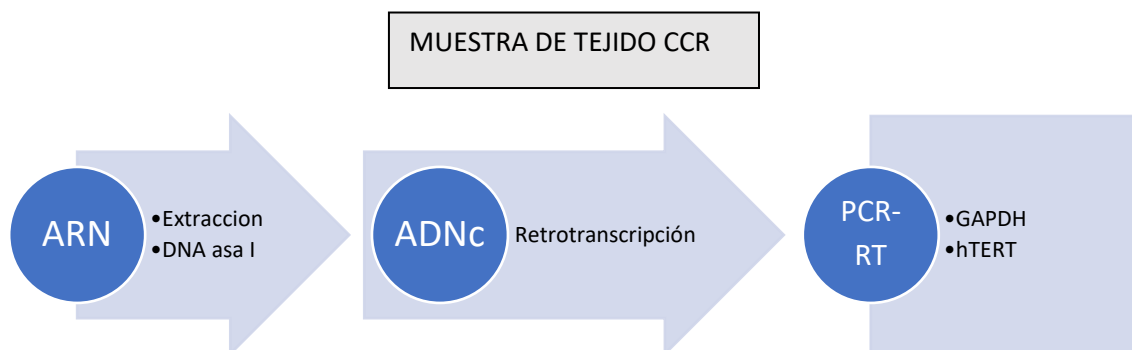


Figura 9. Esquema del procesamiento de muestras de tejido CCR.

3.3.2 b1. Detección y cuantificación de GAPDH ARNm en pieza tumoral.

Los niveles de expresión de GAPDH son prácticamente constantes, por lo que la detección de este ARNm sirvió para evaluar la eficiencia de la reacción de transcripción, así como la cantidad y calidad del ARNm extraído.

Se aplicó una técnica de PCR en tiempo real (PCR-RT) para detectar GAPDH ARNm en el grupo de 111 muestras de tejido de CCR y de 94 tejidos renales sanos adyacentes a la zona del tumor. La técnica de PCR-RT se basa en el uso de sondas fluorescentes (sondas “Taqman”), en las que el extremo marcado con fluoresceína (*reporter*) es absorbida por el marcado con rodamina (*quencher*). Si hay replicación, la actividad exonucleasa 5'-3' de la Taq polimerasa hace que la sonda se convierta en nucleótidos libres, por lo que se elimina esa transferencia entre los dos marcajes y se emite fluorescencia.

Para la amplificación de un fragmento de 226 pb del ADNc de GAPDH, se emplearon dos cebadores y una sonda Taqman específica, cuyas secuencias quedan detalladas en el Anexo II.

Para elaborar la mezcla de reacción, se empleó el *kit* denominado “*LC DNA MasterPLUS Hyb Probes*” (Roche Diagnostics GmbH®, Mannheim, Alemania), que contenía la ADN polimerasa, los desoxinucleótidos y el cloruro de magnesio necesarios para la reacción. En cada mezcla de reacción se añadió 1µl de la enzima uracil ADN glicosilasa (Roche Diagnostics GmbH®) para reducir el riesgo de contaminaciones con amplificados humanos previos. No obstante, en cada sesión de RT-PCR se incluyó un control negativo (con agua, en vez de ARN molde), para detectar ese tipo de contaminaciones, y un control positivo con ARN extraído de un tumor testado previamente y positivo a la detección de GAPDH.

Las muestras de ARN junto con los cebadores, sonda y mezcla de reacción, se sometieron a 45 ciclos de temperaturas, según el patrón que aparece en la figura 10.

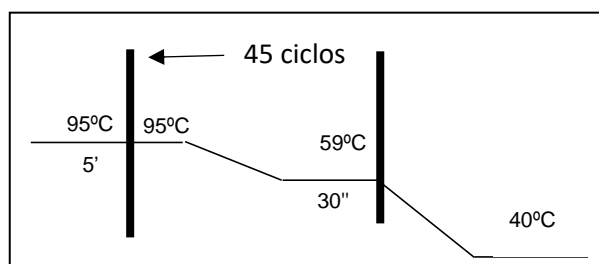


Figura 10. Patrón de temperaturas empleado en la amplificación del ADNc de GAPDH.

Las reacciones, así como la interpretación de resultados a través del ciclo umbral (*Crossing Point*; Cp) se realizó con el sistema LightCycler (“*LightCycler software*”, versión 3.5; Roche®, Vedbaek, Denmark).

Como GAPDH es un control endógeno únicamente se realizó 1 réplica para verificar que nuestras muestras estaban en condiciones óptimas.

3.3.2 b2. Detección de hTERT ARNm en pieza tumoral.

Con el objetivo de determinar la expresión de hTERT en los tumores de los pacientes con CCR y compararla con la de los tejidos renales sanos adyacentes al tumor, se aplicó una técnica de PCR-RT para detectar el ARNm específico (hTERT ARNm) en un subgrupo de 111 muestras de tejidos tumorales y 94 muestras de tejidos renales sanos adyacentes. El proceso de cuantificación por PCR-RT del ARNm hTERT fue similar al descrito para el ARNm de GAPDH, amplificando en este caso un segmento de 96 pb del ADNc de la subunidad hTERT de la telomerasa humana, empleando dos cebadores y una sonda Taqman específica para hTERT, cuyas secuencias se describen en el Anexo II.

Las muestras de ARN junto con los cebadores, sonda y mezcla de reacción, se sometieron a 47 ciclos de temperaturas, según el patrón que aparece en la Figura 11.

Cada muestra se analizó por triplicado (3 réplicas) y se anotó el resultado en número de réplicas y el Cp, que se define como el número de ciclo a partir del cual se detecta fluorescencia en ascensión exponencial. Ver figura 12 y 13.

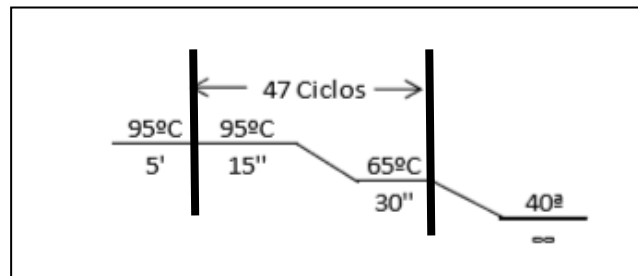


Figura 11. Patrón de temperaturas empleado en la amplificación del ADNc de hTERT.

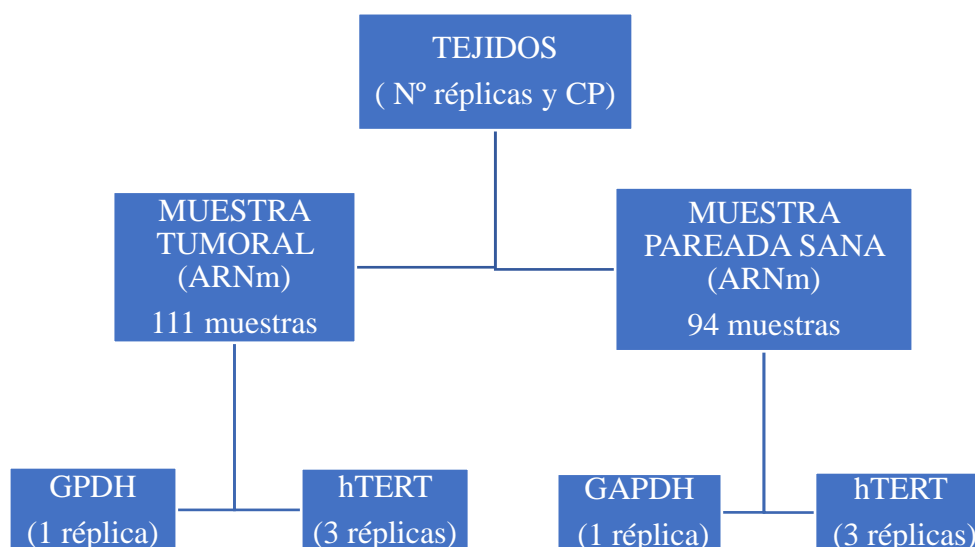


Figura 12. Esquema del análisis de las muestras de tejidos.

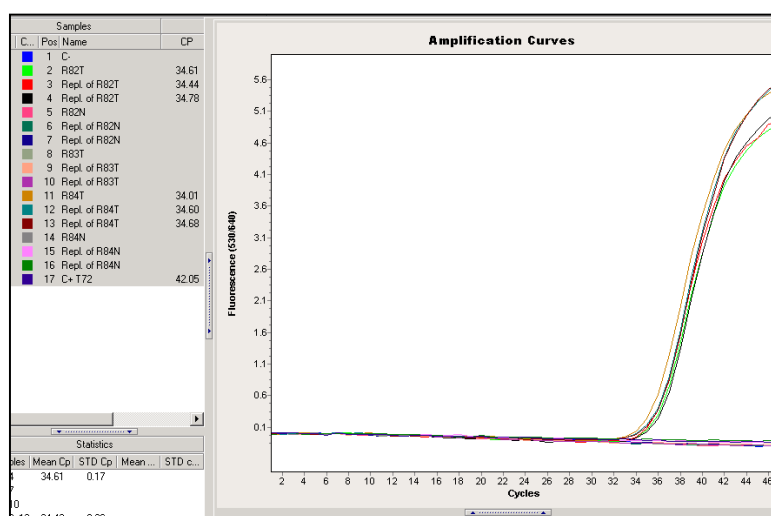


Figura 13. Resultado gráfico de una prueba de PCR-RT para amplificación de hTERT ADNc. En la columna de la izquierda se indican las muestras incluidas y los Cp de cada una de las que resultaron positivas.

3.3.3. Análisis de plasma:

3.3.3a. Extracción y cuantificación de ADN plasmático.

Se realizó el análisis del ADN circulante plasmático de los pacientes con diagnóstico de CCR en diferentes momentos de la evolución de su enfermedad en los que se extrajeron muestras de sangre (Figura 14):

En cada punto del estudio se analizó en plasma:

- ADN hTERT
- ADN GAPDH
- ADN varias secuencias.

De forma paralela se determinaron estos parámetros en las muestras recogidas de los voluntarios sanos.

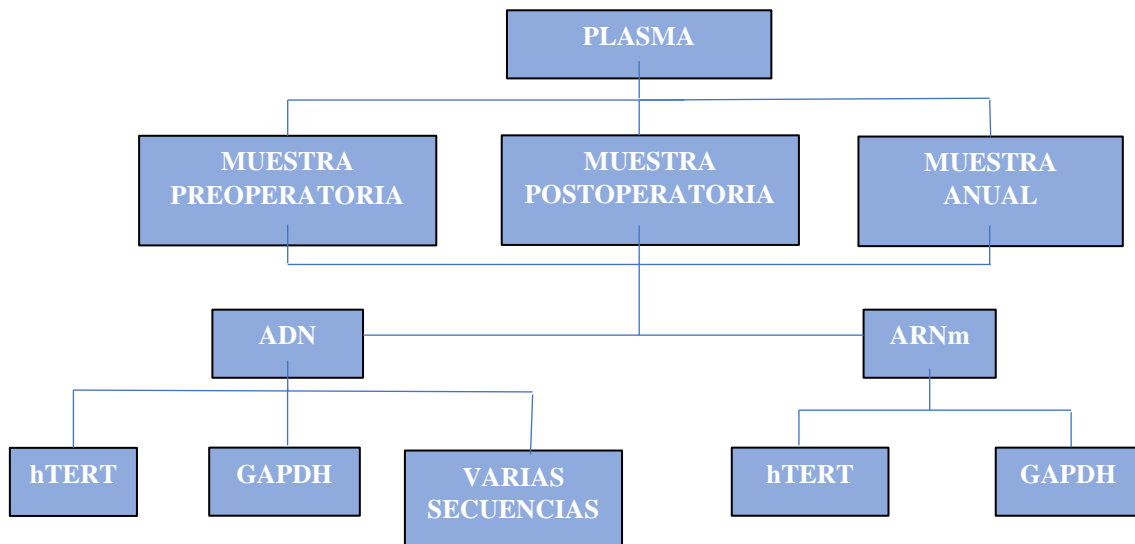


Figura 14. Esquema de la determinación de los biomarcadores en plasma en los diferentes momentos del estudio.

Para la cuantificación de ADN en plasma (hTERT ADN, GAPDH ADN y ADN varias secuencias) se procedió primero a su extracción mediante un *kit* comercial (*Danagen circulating DNA minikit*, Danagen-biotech®, Barcelona, España) que permite la obtención rápida y segura de ADN circulante de alta calidad a partir de 1 ml de plasma fresco o congelado. Una vez extraído se congeló a -20°C hasta su procesamiento.

Para establecer la cuantificación se incluyeron estándares de concentración conocida. Los niveles se obtuvieron en femtogramos (fg), que después se recalcularon en fg/ml de plasma.

Se generaron curvas estándar (Figura 13) para el ADNc de hTERT a partir de diluciones seriadas de cantidades conocidas de secuencias idénticas a las que se pretendía amplificar. Estas secuencias se generaron mediante PCR (con la misma técnica descrita para tejidos), se purificaron empleando el kit “*Montage DNA Gel Extraction*” (Millipore, Bedford, EE.UU.), se cuantificaron mediante el sistema NanoDrop, y se realizaron diluciones seriadas entre 1/10 y 1/10¹², con las que se realizó una reacción de PCR en tiempo real, de la que se extrajo una curva estándar externa, que permitió relacionar el ciclo umbral de detección de fluorescencia obtenido en cada muestra con la cantidad de ADNc diana que contenía. En cada PCR se incluyeron 4 estándares, eligiéndose después uno de ellos como referencia en la cuantificación con la curva estándar externa. Este proceso se realizó en 61 pacientes y en 22 controles sanos. En este estudio se cuantificó hTERT ADN, GAPDH ADN e igualmente se realizó una cuantificación alternativa de ADN total de varias secuencias (Figura 15):

- 1º) Cuantificación de hTERT ADN, expresado en femtogramos por ml (fg/ml), ya descrito en el párrafo anterior.
- 2º) Cuantificación de GAPDH ADN. Se siguió el mismo proceso que con hTERT, con una curva estándar específica.
- 3º) Cuantificación de varias secuencias de ADN total, mediante el empleo de un *kit* comercial estándar (*cfhDNA monodose dtec-qPCR Test*®, Danagen-biotech), que determina varias secuencias de ADN circulante. El resultado de esta cuantificación se midió en número de copias por microlitro (copias/μl). El uso de este *kit* implica la determinación de 5 genes constitutivos y su aplicación se llevó a cabo según el protocolo de referencia. En el capítulo de resultados, los datos del análisis de esta cuantificación alternativa a la realizada con GAPDH se expresan como ADN total libre, si bien la determinación de GAPDH también es ADN total, de cara a la redacción del texto los diferenciaremos de esta forma. El motivo de la determinación tanto de GAPDH ADN como la determinación *alternativa* (doble técnica) fue evaluar la utilidad del *kit* comercial para la cuantificación de ADN en plasma al compararlo con el análisis de GAPDH, que es nuestra herramienta habitual para la cuantificación de ADN en plasma.

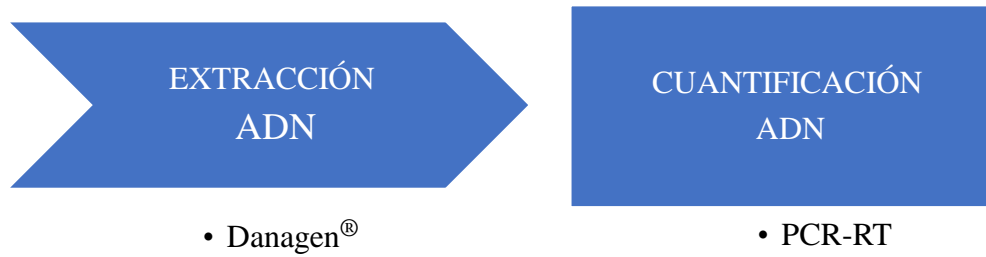


Figura 15: Esquema de la extracción y cuantificación de ADN plasmático

3.3.3b. Extracción y cuantificación de ARNm plasmático

Se realizó la extracción de ARNm en 77 casos y 31 controles, mediante un *kit* comercial (*Qiamp UltraSens Virus Handbook*®. Qiagen) y posteriormente se llevó a cabo una retrotranscripción para obtener ADNc, realizada mediante el *kit* “*Quantitect reverse transcription*” (Qiagen) para posteriormente congelar la muestra a -20°C.

El proceso de cuantificación de GAPDH ARNm mediante PCR-RT fue similar al descrito en la detección de GAPDH ARNm en muestras de tejido, salvo que en la determinación de ARNm plasmático se utilizaron 3 réplicas. La cuantificación se realizó, al igual que en el proceso en los tejidos, en fg/ml y los resultados se interpretaron con el sistema *Light Cycler*®, mediante curvas estándar. Para ello se empleó la sonda específica de GAPDH (sonda Taqman).

El proceso de cuantificación de hTERT ARNm en plasma fue el mismo que se ha descrito previamente para el procesamiento de GAPDH ARNm, utilizando igualmente 3 réplicas. La cuantificación se realizó en fg/ml y los resultados se interpretaron con *Light Cycler*®, mediante curvas estándar. Para ello se empleó la sonda específica de hTERT (sonda Taqman).

3.4 VARIABLES DEL ESTUDIO

3.4.1 Base de datos

Se diseñó una base de recogida de datos mediante el programa estadístico SPSS v.20 (SPSS Inc., Chicago, EEUU). En ella se incluía, para cada paciente, un número, código de muestra y datos de filiación. En los pacientes estudiados se aplicó un protocolo de recogida de datos para analizar variables socio-demográficas, clínicas, histopatológicas, factores de riesgo conocidos y respuesta a tratamientos complementarios en los casos en que fueron necesarios. Además, se recogieron fecha de nacimiento, fechas de intervención y alta, fechas de la toma de las muestras postoperatorias y anuales, y fecha del último seguimiento del paciente y de exitus o progresión. Las variables fueron clasificadas y recodificadas de la siguiente manera:

3.4.2 Variables independientes del estudio.

3.4.2a. Variables socio-demográficas:

- Sexo: 0 = mujer, 1 = varón.
- Edad, en años cumplidos.
- Exitus del paciente durante el seguimiento, codificado como:
0 = no exitus, 1= exitus.

- Estado actual del paciente. Codificado como:

0 = estable, 1 = Progresión (clínica o radiológica) o exitus.

3.4.2b. Variables del paciente:

- Tabaquismo: 0 = fumador; 1 = no fumador o exfumador.
- Hipertensión: 0 = no HTA, 1 = HTA.

- Obesidad: 0 = no obesidad, 1 = obesidad.
- Dislipemia: 0 = no DLP, 1 = DLP.
- Índice de Masa Corporal (IMC): en valor numérico.
 - Grado de obesidad según la Clasificación de la Obesidad de la OMS (2007):⁽⁶⁸⁾
 - normopeso: IMC 18,5-24,9
 - sobrepeso: IMC 25-29,9
 - obeso: IMC 30-34,9
 - obeso severo: IMC 35-39,9
 - obeso mórbido: IMC > 40

3.4.2c. Variables relacionadas con el tumor:

- Motivo de consulta: síntoma por el que el paciente acude por primera vez:
 - 0 = Incidental.
 - 1 = Hematuria.
 - 2 = Dolor lumbar.
 - 3 = Hematuria y dolor lumbar.
 - 4 = Síndrome constitucional.
 - 5 = Otras.
- Lateralidad: Si el tumor aparece en riñón derecho (0), izquierdo (1) o bilateral (2).
- Tamaño del tumor: medido en centímetros por el patólogo sobre la pieza de nefrectomía.
- Multiplicidad: En función del número de focos encontrados (en la misma pieza o existencia de tumor bilateral):
 - 0= tumor único, 1=tumor múltiple.

- Afectación de bordes quirúrgicos: Si el límite de resección está afectado por el tumor: Valorado por el patólogo sobre la pieza quirúrgica.

0 = no, 1 = sí.

- Estudio histológico del tumor:

0 = CCR célula clara.

1 = CCR papilar renal.

2 = CCR cromóforo.

3 = CR con diferenciación sarcomatoide.

4 = Oncocitoma.

5 = CCR sin histología / inclasificado.

Para el estudio de ADN y ARNm circulante en plasma se excluyeron los oncocitomas, recodificándose como:

0 = No CCRcc, 1 = Si CCRcc.

- Grado de diferenciación nuclear, según la clasificación de Fuhrman,⁽¹¹⁾ recodificándose para el análisis estadístico en:

0 = Bajo grado (grados 1 y 2), 1 = Alto grado (grados 3 y 4).

- Estadio tumoral, según la clasificación TNM 2017 de la UICC:⁽¹²⁾

-Estadio T: T1a, T1b, T2a, T2b, T3a, T3b, T3c y T4. En función de tamaño y extensión topográfica del tumor en el riñón y afectación de estructuras anexas. Se recodificaron para el análisis estadístico en:

0 = Estadios pT1 y pT2; 1 = Estadios pT3 y pT4.

-Estadio N: afectación de ganglios regionales. Se usó únicamente la clasificación clínica, no la patológica y se recodificó en:

0 = Estadios Nx y N0, 1 = Estadio N1 o superiores.

-Estadio M: Afectación metastásica a distancia:

0 = M0 ó Mx, 1 = M1.

-Estadio TNM: clasificados en estadios I, II, III y IV. Para su análisis se clasificó en:

0= Estadios TNM I y II, 1 = Estadios TNM III y IV.

3.4.2d. Variables relacionadas con la intervención quirúrgica:

- Abordaje quirúrgico: Tipo de técnica quirúrgica:

0 = Nefrectomía radical, subcostal, lumbotomía o laparoscópica.

1 = Nefrectomía parcial, laparoscópica o por lumbotomía.

- Aparición de complicaciones inmediatas. 0= no, 1 = sí.

- Afectación de bordes quirúrgicos: 0 = no, 1 = sí.

3.4.2e. Variables relacionadas con tratamientos adyuvantes:

- Tratamiento con quimioterapia (0 = no, 1 = sí) y tipo de fármaco usado:

- Pazopanib (Novartis Europharm, Irlanda).

- Sunitinib (Pfizer, Bélgica).

- ambos.

- no necesidad de tratamiento quimioterápico.

- Tratamiento con radioterapia: (0 = no, 1 = sí).

3.4.3 Variables dependientes del estudio.

- Cuantificación GAPDH ARNm en muestra de tejido CCR de los casos, medidas mediante el Cp.

- Cuantificación GAPDH ARNm en muestra de tejido renal sano adyacente al tumor, medidas mediante el Cp.

- Cuantificación de hTERT ARNm en muestra de tejido CCR de los casos, medidas mediante el Cp y el número de réplicas.

- Cuantificación de hTERT ARNm en muestra de tejido renal sano adyacente al tumor, medidas en el Cp y el número de réplicas.
- Cuantificación en plasma de GAPDH ADN, hTERT ADN, ADN total de varias secuencias (*MONODOSE*[®]), GAPDH ARNm y hTERT ARNm en el preoperatorio, postoperatorio y al año de la intervención, medidas en fg/ml salvo para el ADN total determinado según el *kit* de varias secuencias (*MONODOSE*[®]) que se expresó en Cp/μl.
- Cuantificación de GAPDH ADN, hTERT ADN, ADN total de varias secuencias (*MONODOSE*[®]), GAPDH ARNm y hTERT ARNm, en muestra única de plasma de los controles.

3.4.4. Análisis estadísticos.

3.4.4a. Análisis descriptivo.

Para describir la distribución de cada variable como índices estadísticos, se calcularon porcentajes en el caso de variables cualitativas y medidas de tendencia central y dispersión para sintetizar la distribución de las variables cuantitativas, así como sus intervalos de confianza. Como índices complementarios, se consideró en estas últimas la asimetría de la distribución y el grado de apuntamiento respecto de la ley normal, con objeto de comprobar la idoneidad en la aplicación de posteriores test estadísticos que exigen la normalidad de la distribución de las variables (prueba Z de Kolmogorov-Smirnov).

Los datos fueron sintetizados mediante la oportuna tabulación y representados gráficamente mediante diagramas rectangulares o sectores proporcionales en el caso de variables nominales u ordinales, diagramas de barras o polígonos de frecuencias en el caso de variables cuantitativas discretas y diagramas de caja o “boxplot” en caso de variables cuantitativas.

3.4.4b. Análisis bivariante.

Para estudiar la asociación o relación entre dos variables cualitativas se utilizó una prueba de independencia para comprobar proporciones observadas en grupos independientes (ji-cuadrado), verificándose las condiciones de aplicación (efectivos esperados no inferiores a 5, empleando corrección de Yates). Cuando no se cumplieron las condiciones de aplicación se empleó la prueba exacta Fisher. En la comparación de proporciones observadas en los mismos sujetos, mediante medidas repetidas, se empleó la prueba de simetría de McNemar.

Para estudiar la relación entre una variable binaria y una cuantitativa, se utilizó la prueba "t" de comparación de medias en grupos independientes basada en la ley de Student-Fisher. La hipótesis de igualdad de varianzas se verificó con la prueba F basada en la ley de Snedecor, suponiendo en ambas pruebas que la variable cuantitativa seguía en la población una ley normal por tratarse de muestras consideradas grandes desde el punto de vista estadístico. También se emplearon pruebas de comparación de medias para medidas repetidas cuando se efectuaron comparaciones en los mismos sujetos. Por último, se utilizaron pruebas no paramétricas (U de Mann-Whitney en grupos independientes y T de Wilcoxon en medidas repetidas) cuando la distribución de alguna de las variables presentaba marcadas anomalías (asimetría, comparar grupos pequeños o cuando se vulneraban los supuestos de normalidad e igualdad de varianzas). También se utilizaron en estos casos pruebas de comparación para las medianas.

3.4.4c. Análisis supervivencia.

Se realizó un análisis de la supervivencia para describir la probabilidad de progresión o fallecimiento a lo largo del estudio.

Dado que el estudio no está diseñado para un análisis de supervivencia global, únicamente se calculó la curva de supervivencia de toda la serie, representando en función del tiempo las probabilidades acumuladas de progresión o fallecimiento en cada momento, utilizándose como técnica el método de estimación y el método de Kaplan-Meier, a través del procedimiento *Survival* del Sistema SPSS. Se utilizó como unidad de medida temporal el mes, definiendo su equivalencia estadística en días (1 mes = 30,4375

días). Se calculó la mediana del tiempo de supervivencia, que es el índice más adecuado para describir la tendencia central de la distribución de supervivencia.

3.4.4d. Análisis de rendimiento diagnóstico de las determinaciones de ADN y ARNm circulante.

La exactitud de una prueba diagnóstica mide la capacidad de una prueba para distinguir entre dos estados de salud. Como método de medida global de la exactitud de la prueba en la predicción de recidiva o exitus por CCR, para el conjunto de todos los posibles puntos de corte en función de los valores de los distintos de ADN y ARNm circulantes, se obtuvo para cada uno de ellos sus correspondientes curvas ROC (*“Receiver Operating Characteristic”*), o curvas de rendimiento diagnóstico, mediante el procedimiento ROC del sistema SPSS.

Para construir la curva, se calcularon la sensibilidad (S); (proporción de diagnósticos sobre el total de sujetos con la enfermedad) y especificidad (E); (probabilidad de diagnósticos negativos entre los sujetos sanos) de cada uno de los posibles puntos de corte, estableciéndose la S en el eje de ordenadas y el complemento de la especificidad (1-E) en el de abscisas. Se hizo una estimación no paramétrica de la curva ROC dibujándola, uniendo cada valor par de S y 1-E. Si el punto corresponde a un empate (un sano y enfermo con igual puntuación en la prueba) se unió con un segmento diagonal. Una vez dibujada la curva, se obtiene el área bajo la curva o AUC (*Area Under Curve*), cuyo valor oscila entre 0,5 y 1. Un valor igual a 1 indica una prueba perfecta ($S = E = 1$). Una prueba sin valor diagnóstico tendrá un valor $S = E = 0,5$.

Mediante los estadísticos de Wilcoxon o su equivalente U de Mann Whitney se puede calcular la significación de la AUC.

En nuestro estudio, para los valores de ADN y ARNm que mostraron un punto de corte significativo en la curva ROC, se calculó además de la sensibilidad y la especificidad, los valores de:

- Falso positivo: sujetos sanos diagnosticados como enfermos.
- Falso negativo: sujetos enfermos diagnosticados como sanos.
- Valor predictivo positivo: proporción de pacientes con enfermedad en el conjunto de sujetos con resultado positivo de la prueba. Sería la

probabilidad condicionada de presentar enfermedad en un sujeto que ha dado positivo en la prueba.

- Valor predictivo negativo: proporción de pacientes sin enfermedad en el conjunto de sujetos con resultado negativo de la prueba. Sería la probabilidad condicionada de estar sano en un sujeto que ha dado negativo en la prueba.
- Eficacia: enfermos diagnosticados correctamente (verdaderos sanos y verdaderos enfermos) sobre el total de pacientes del estudio.

3.4.5 Consideraciones éticas.

El estudio fue aprobado por el Comité Ético de Investigación Clínica de la Gerencia de Atención Integrada de Albacete el 23 de abril de 2015 (Acta 4/2015 CEIC). Todos los participantes del estudio, ya fueran pacientes o voluntarios sanos, fueron informados del objetivo del estudio y de la finalidad de la toma de muestras para investigación, autorizándonos por medio del pertinente consentimiento informado. La participación en el estudio fue voluntaria.

4. RESULTADOS

4.1. ANÁLISIS DESCRIPTIVO DE LA MUESTRA, VARIABLES SOCIODEMOGRÁFICAS, CLÍNICAS Y PATOLÓGICAS

4.1.1. Edad.

La edad media de los pacientes en el momento de la intervención y de la toma inicial de las muestras de sangre fue de 60,7 años, con rango entre 32,6 y 88,2 años (IC 95%: 58,1-63,2; DE: 14,1) y una mediana de 61,2. La edad de la población analizada presentó una distribución normal (Z de Kolmogorov- Smirnov: 1,08; $p = n. s$). Por otra parte, la edad media de los controles fue 57,0 años, sin objetivarse diferencias significativas en la edad entre los casos y los controles (Figura 16).

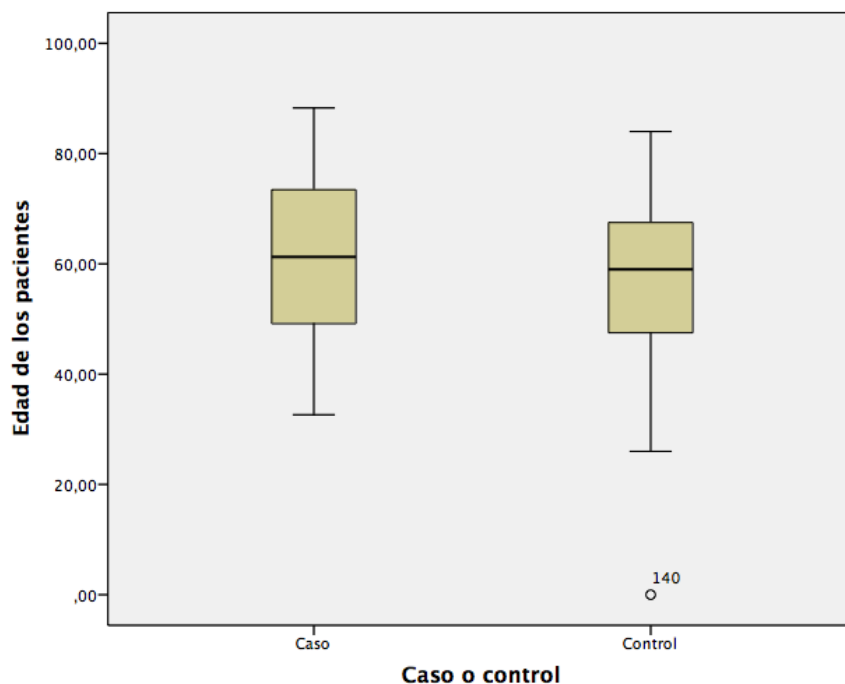


Figura 16: Representación gráfica de la distribución la edad de casos y controles.

4.1.2 Sexo.

La muestra del estudio estuvo compuesta por 84 varones (70%) y 36 mujeres (30%). Dentro de los sujetos del grupo control, los varones representaron 84% (26 casos). No se encontraron diferencias significativas en la distribución de sexos según fuese caso o control y tampoco hubo diferencias estadísticamente significativas entre sexo y edad.

4.1.3 Lateralidad y clínica.

La lateralidad se distribuyó de forma homogénea en ambos riñones. La clínica de debut más frecuente que llevó al diagnóstico de la enfermedad fue el hallazgo incidental en el marco de una prueba de imagen por otro motivo, lo que sucedió en 92 pacientes (77%). Otras causas recogidas fueron la presencia de hematuria, dolor lumbar y síndrome constitucional, aunque en menor porcentaje. Los datos globales de este apartado se muestran agrupados en la Tabla 4.

Tabla 4. Distribución de lateralidad de las lesiones renales y clínica de debut en los pacientes con CCR.

		Frecuencia	porcentaje
Lateralidad	Derecha	61	51%
	Izquierda	59	49%
	Total	120	100 %
Clínica de debut	Incidental	92	77%
	Hematuria	12	10%
	Dolor lumbar	5	4%
	Dolor + Hematuria	4	3%
	Síndrome constitucional	2	2%
	Otras	5	4%
	Total	120	100%

4.1.4 Factores de riesgo relacionados con CCR

Se detectaron, en nuestra población de estudio, los siguientes factores de riesgo relacionados con el desarrollo de los CCR:

- Obesidad: los pacientes presentaron un IMC medio de 28,3 (IC95%: 27,4-29,3; DE: 5,3) con una mediana de 27,2 y un rango comprendido entre 27,4 y 29,3. El IMC de la población no presentó una distribución normal ($Z = 1,41$; $p=0.036$). La gradación de la obesidad según la clasificación de la OMS de 2007 fue: 40% sobrepeso, 27% normopeso, 20% obesos, 9% obeso severo y 4% obesos mórbidos.
- Hipertensión arterial (HTA): El 57% de los pacientes eran hipertensos.
- Hábito tabáquico: 58% de nuestros pacientes eran fumadores o exfumadores.
- Antecedentes de otras neoplasias se encontraron en el 3%.
- Insuficiencia renal crónica (IRC) que padecían el 3% de los enfermos.

4.1.5 Variables relacionadas con la intervención quirúrgica.

4.1.5a. Tipo de técnica quirúrgica.

El abordaje más empleado fue la nefrectomía radical por lumbotomía, que se utilizó en 42 casos, seguido por la nefrectomía radical laparoscópica en 37 enfermos. Los porcentajes de los diferentes abordajes empleados se muestran en la Figura 17.

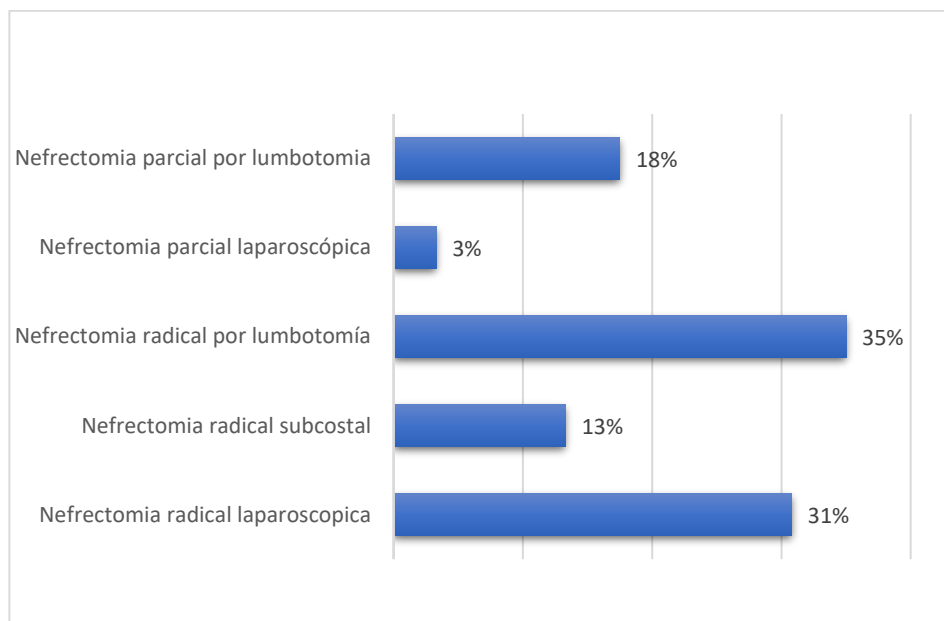


Figura 17. Distribución en porcentaje de los distintos abordajes quirúrgicos realizados.

4.1.5b. Duración de la hospitalización.

La media de ingreso fue de 5 días (IC95%: 4,9-6,2 DE: 4,8). La mediana fue de 4 días, con un rango de 2 a 35 días. El tiempo de ingreso no presentó una distribución normal ($Z = 3,43$; $p < 0,001$)

4.1.5c. Aparición de complicaciones.

En 8 pacientes (7%) se presentó algún tipo de complicación peri o postoperatoria inmediata, todas ellas de carácter menor, salvo en un caso de complicación de origen vascular que finalizó en *exitus* del paciente a las 48 horas de la intervención.

4.1.6 Variables relacionadas con el tumor.

4.1.6a. Número de lesiones y tamaño tumoral.

El tamaño medio de la lesión según la descripción anatomopatológica fue de 5,5 cm. (IC95%: 4,9 – 6.1; DE: 3,2) con una mediana de 4,5 cm. y un rango entre 0,8 y 16 cm.

El tamaño tumoral no presentó una distribución normal ($Z = 1.46$; $p < 0.028$). En 8 pacientes (7%) los tumores fueron múltiples.

4.1.6b. Histología.

En el estudio anatomopatológico de las piezas quirúrgicas se determinó que el tipo más frecuente de carcinoma de células renales fue el subtipo histológico de células claras (CCRcc), presente en 80 pacientes, seguido por el carcinoma papilar en 15 casos, 12 carcinomas cromófobos, 11 oncocitomas y 2 casos con diferenciación sarcomatoide. En la Figura 18 se muestran los porcentajes de las diferentes variables histológicas.

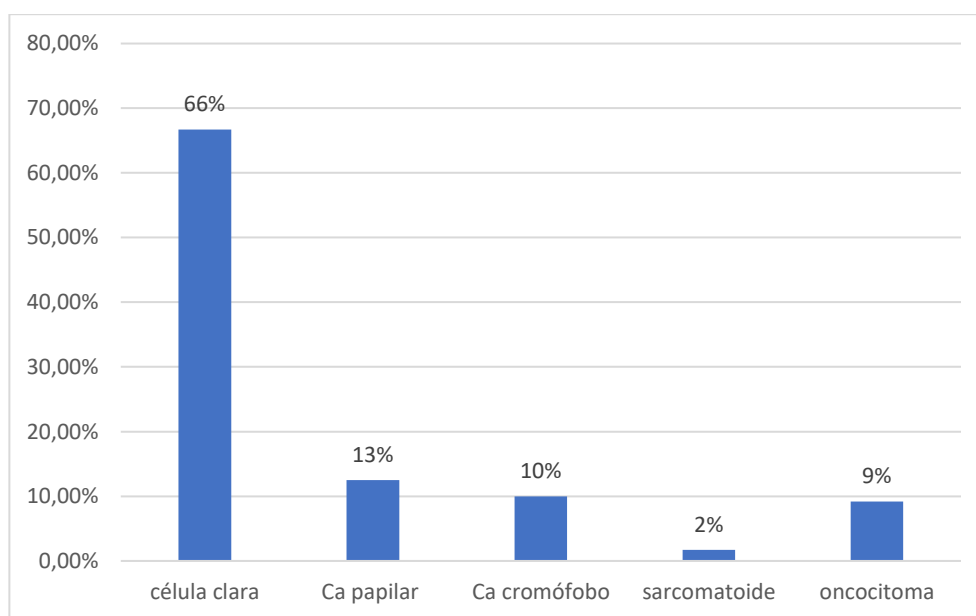


Figura 18. Distribución de los diagnósticos histopatológicos de las muestras tumorales incluidas en el estudio.

4.1.6c. Grado de Furhman.

El grado de diferenciación nuclear de Furhman más frecuentemente encontrado fue el grado 2 (50 pacientes), seguido por el grado 3 en 27 pacientes, el grado 4 en 12 y 7 pacientes presentaron grado 1. En 24 pacientes de nuestra serie la determinación del grado de Furhman no fue procedente por su histología (oncocitomas, algunos papilares y cromófobos). En la Figura 19 se muestra la distribución de los diferentes grados de Furhman de nuestra población de estudio.

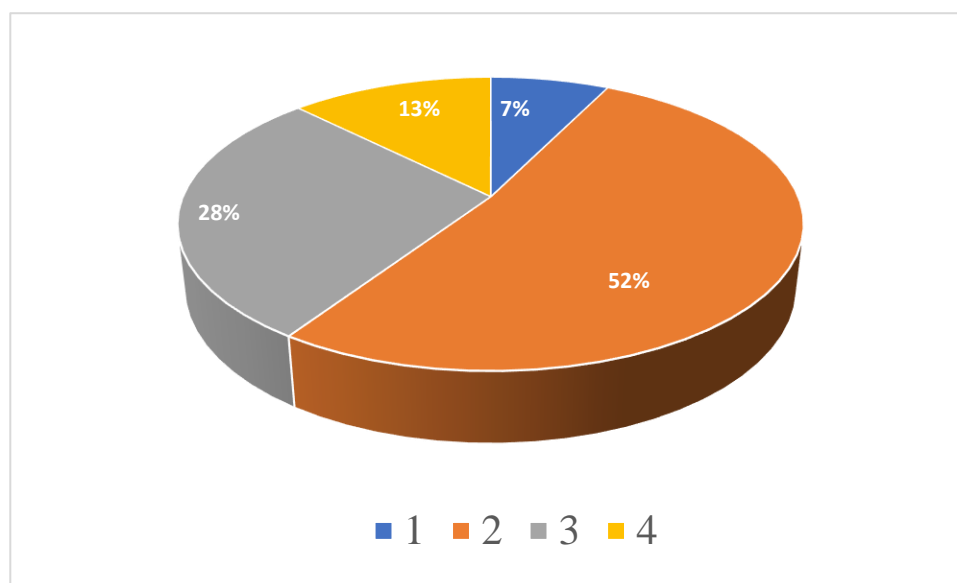


Figura 19. Distribución del grado de Furhman de los tumores de la serie.

4.1.6.d. Estadio tumor primario (pT).

El estadio pT más frecuente correspondió al pT1a, con 37 casos (34%), siendo los estadios pT2b, pT4 y T3c los menos frecuentes. En la Tabla 5 se muestra la distribución de los distintos estadios TNM de los pacientes de la serie.

4.1.6e. Afectación ganglionar regional (N)

De los 120 casos analizados, solo 5 casos presentaron afectación de los ganglios regionales (N1), si bien en la mayoría de los casos no se realizó linfadenectomía (Nx). (Tabla 5).

4.1.6f. Metástasis a distancia (M)

Del total de la serie, 15 pacientes presentaron metástasis a distancia en el momento del diagnóstico (13%), 94 pacientes fueron M0 (78%) y en 11 casos (9%) no se determinó la afectación metastásica al corresponder a histología compatibles con oncocitomas (Tabla 5). De los 15 casos M1, predominaron las metástasis (de forma aislada o conjunta) en localización pulmonar o mediastínica (9 pacientes), suprarrenal en 4 pacientes, 4 en el sistema nervioso central y únicas en hueso, hígado e invasión local.

4.1.6g. Afectación por estadios TNM.

El estadio más frecuentemente encontrado fue el I. El resto de estadios se distribuyó de manera homogénea según se observa en la Tabla 5.

Tabla 5 Distribución de los tumores analizados en el estudio según clasificación TNM.⁽¹²⁾

VARIABLES		FRECUENCIA	PORCENTAJE (%)
Estadio pT	pT1a	37	34
	pT1b	27	25
	pT2a	11	10
	pT2b	5	5
	pT3a	16	15
	pT3b	8	6
	pT3c	0	0
	pT4	5	5
	Total	109	100
Estadio N	N0	49	45
	N1	5	5
	Nx	55	50
	Total	109	100
Estadio pM	pM0	94	86
	pM1	15	14
	Total	109	100
Estadio TNM	I	64	58
	II	15	14
	III	16	15
	IV	14	13
	Total	109	100

Nota al pie de tabla: no se incluyen los 11 casos de oncocitomas dado que no es aplicable en esta histología

4.1.7 Necesidad de tratamientos adyuvantes

4.1.7a. Quimioterapia.

Se administró quimioterapia adyuvante a 7 pacientes (6%). El quimioterápico más frecuentemente usado fue pazopanib en 4 pacientes (3%), seguido por sunitinib en 2 casos (2%) y un caso con uso de ambos.

4.1.7b. Radioterapia.

Se empleó radioterapia, como tratamiento de la enfermedad metastásica, en 3 pacientes (2,5%), aplicándose a nivel pulmonar, óseo y del SNC.

4.1.8 Seguimiento.

El periodo de seguimiento osciló entre 0,5 y 38,8 meses, con una media de seguimiento de 21,6 meses (IC95%: 19,7 – 23,5; DE: 10,6) y una mediana de 22,4 meses.

Durante este tiempo se produjeron 8 exitus (7%) y 3 pacientes (2,5%) mostraron progresión clínica de su enfermedad. De forma conjunta, un 9% de los enfermos del estudio habían muerto o progresado. En la Figura 20 se muestra la curva de progresión y exitus de los pacientes de la serie.

La probabilidad acumulada de permanecer estable a los tres años de inicio del estudio fue del 74%. La media de supervivencia o no progresión de los pacientes del estudio fue de 2,9 años (IC95%: 2,8 – 3,1).

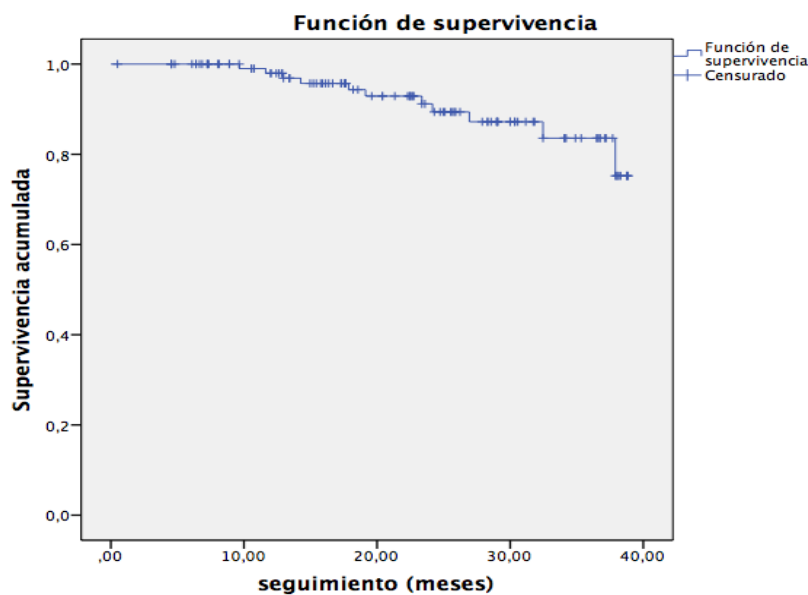


Figura 20. Curva de supervivencia y progresión de los pacientes del estudio

4.2.- DETECCIÓN DE ARNm EN MUESTRA DE TEJIDO

4.2.1. Detección de GAPDH ARNm en tejido tumoral y en muestra de tejido sano adyacente.

Todas las muestras de tejido tumoral y de tejido sano adyacente al tumor expresaron GAPDH ARNm, siendo el Cp medio en muestra tumoral de 24,3 (IC95%: 23,6-25,01; mediana 23,4; DE 3,1), significativamente menor respecto al Cp del tejido sano adyacente, que presentó una media de 27,2 (IC95%: 26,4-28,0; mediana 26, DE 4,2); ($p < 0.001$).

4.2.2. Detección de hTERT ARNm en tejido tumoral y en tejido sano adyacente al tumor.

En el 68% de las muestras de tejido tumoral se detectó la expresaron de hTERT ARNm, por un 33% en muestras de tejido sano adyacente al tumor ($p < 0.001$). En las muestras de tejido tumoral el Cp medio de hTERT ARNm en muestra tumoral fue de 36,6 (IC95%: 36,1 – 37,1; mediana 37,0; DS 0,9). En la muestra de tejido sano adyacente, el Cp medio de hTERT ARNm fue de 37,7 (IC95%: 37,3-38,2; mediana: 37,7; DS 0,9).

La expresión de hTERT ARNm apareció en todos los CCR con diferenciación sarcomatoide, y en menor medida en CCRcc y CCR papilar. Estas diferencias en la expresión de hTERT ARNm según los diferentes subtipos histológicos fueron estadísticamente significativas ($p < 0.0001$). En el resto de variables no se halló asociación con la expresión de hTERT ARNm. Estos datos se detallan en la Tabla 6 y en la Figura 21.

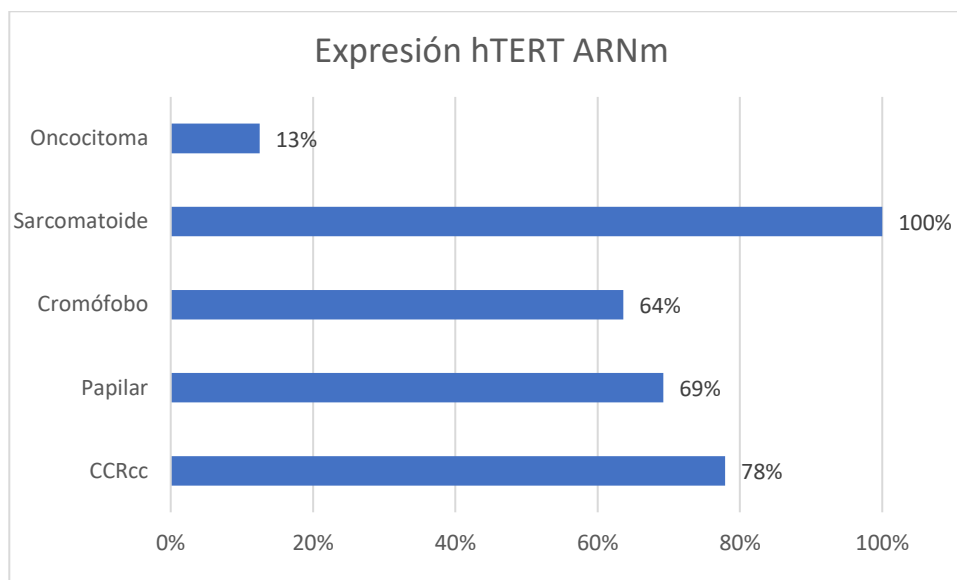


Figura 21. Distribución de la expresión de hTERT ARNm en tejidos tumorales según la histología.

La Figura 22 muestra los Cp medios de los diferentes subtipos histológicos, destacando que el Cp de los CCR con diferenciación sarcomatoide, fue menor al del resto de subtipos histológicos (media: 29,2; IC95; 22.1 -36.20; $p < 0,001$), lo que implica una mayor expresión de hTERT ARNm que en el resto de subtipos. En la Tabla 7 se muestran los diferentes Cp en función de las variables anatomopatológicas analizadas, pudiéndose comprobar también como los Cp de los tumores metastásicos, con afectación ganglionar y los estadios TNM IV fueron significativamente inferiores en relación a los no metastásicos, libres de adenopatías y a estadios TNM inferiores (Figuras 23, 24 y 25).

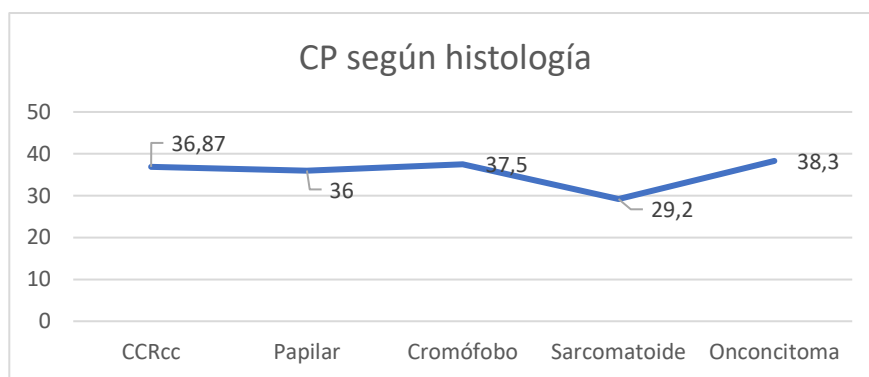


Figura 22. Representación del Cp según la histología de las muestras tumorales analizadas en el estudio. Destaca que el CP más bajo corresponde a la diferenciación sarcomatoide, lo que se traduce en una mayor expresión de hTERT ARNm que en el resto de subtipos histológicos.

Tabla 6. Expresión de hTERT ARNm en muestras tumorales según las distintas variables anatomopatológicas analizadas en el estudio.

VARIABLES		Expresión hTERT ARNm (%)		p
		Si	No	
Histología	Células claras	60 (77,9)	17 (22,1)	< 0.0001
	Papilar	9 (69,2)	4 (30,8)	
	Cromóforo	4 (36,4)	7 (63,6)	
	Dif. Sarcomatoide	2 (100)	0	
	Oncocitoma	1 (12,5)	7 (87,5)	
Grado Furhman	1	4 (57,1)	3 (42,9)	n. s.
	2	33 (70,2)	14 (29,8)	
	3	22 (81,5)	5 (18,5)	
	4	10 (83,3)	2 (16,7)	
pT	1	39 (68,4)	18 (31,6)	n.s.
	2	12 (75)	4 (25)	
	3	19 (86,4)	3 (13,6)	
	4	4 (80)	1 (20)	
N	0	70 (74,5)	24 (25,5)	n. s.
	1	4 (98,6)	1 (1,4)	
pM	0	63 (70,0)	27 (30,0)	n. s.
	1	12 (92,3)	1 (7,7)	
Estadio TNM	I	39 (67,2)	19 (32,8)	n. s.
	II	11 (73,3)	4 (26,7)	
	III	11 (73,3)	4 (26,7)	
	IV	13 (92,9)	1 (7,1)	

Tabla 7. *Crossing Point* de hTERT ARNm en muestra de CCR según las distintas variables anatomopatológicas analizadas en el estudio.

VARIABLES		Media	IC95%	p
Histología	Células claras	36,9	36,4 - 37,3	< 0,001
	Papilar	36	34,4 - 37,6	
	Cromóforo	37,5	36,7 - 38,20	
	Dif. Sarcomatoide	29,2	22,1 - 36,2	
	Oncocitoma	38,3	-	
Grado Furhman	1	37,5	37,0 - 38,1	n. s.
	2	37	36,4 - 37,5	
	3	36,7	35,7 - 37,8	
	4	35,7	36,9 - 37,4	
pT	1	36,9	36,2 - 37,6	n. s.
	2	36,5	35,6 - 37,4	
	3	36,5	35,4 - 37,6	
	4	34,1	29,2 - 39,5	
N	0	36,7	36,2 - 37,2	0,018
	1	33,9	29,3 - 38,5	
pM	0	36,9	36,4 - 37,4	0,046
	1	34,9	33,1 - 36,8	
Estadio TNM	I	36,9	36,2 - 37,6	0,041
	II	36,6	35,5 - 37,6	
	III	37,4	36,6 - 38,1	
	IV	35,1	33,3 - 36,8	

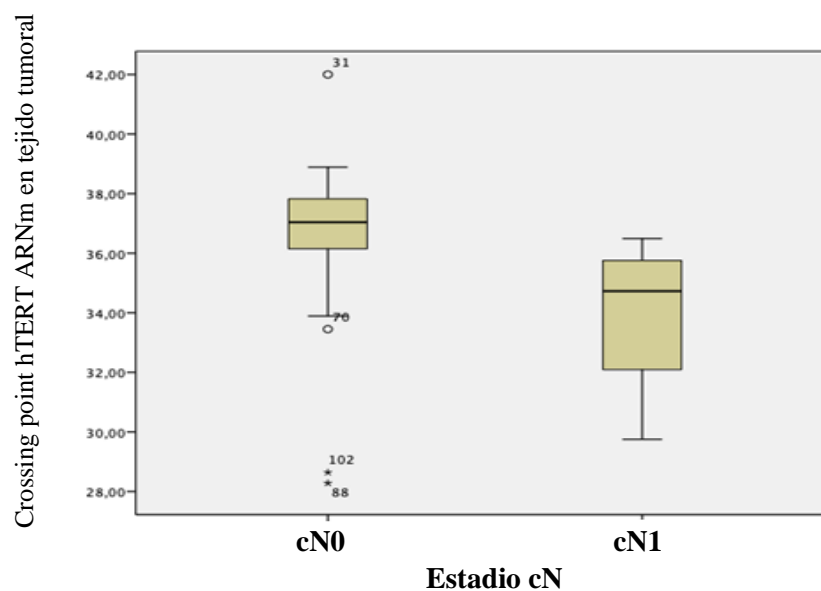


Figura 23. *Crossing Point* de hTERT ARNm en el tejido tumoral analizado en estadio cN.

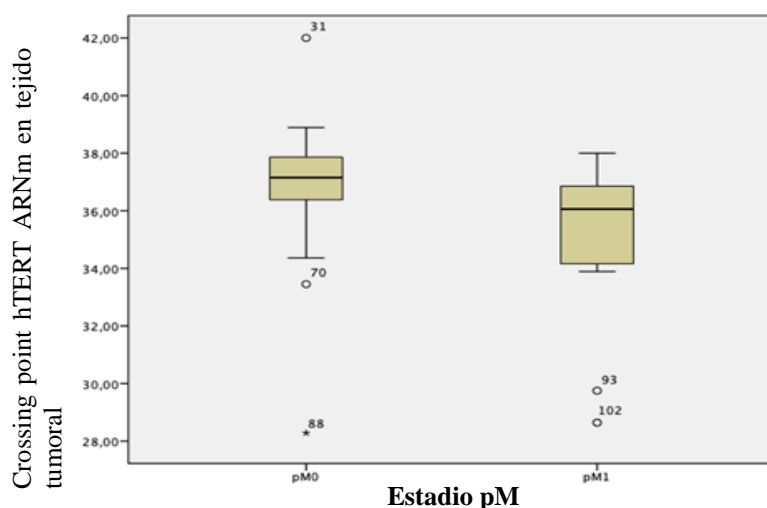


Figura 24. Crossing Point de hTERT ARNm en el tejido tumoral analizado según estadio pM.

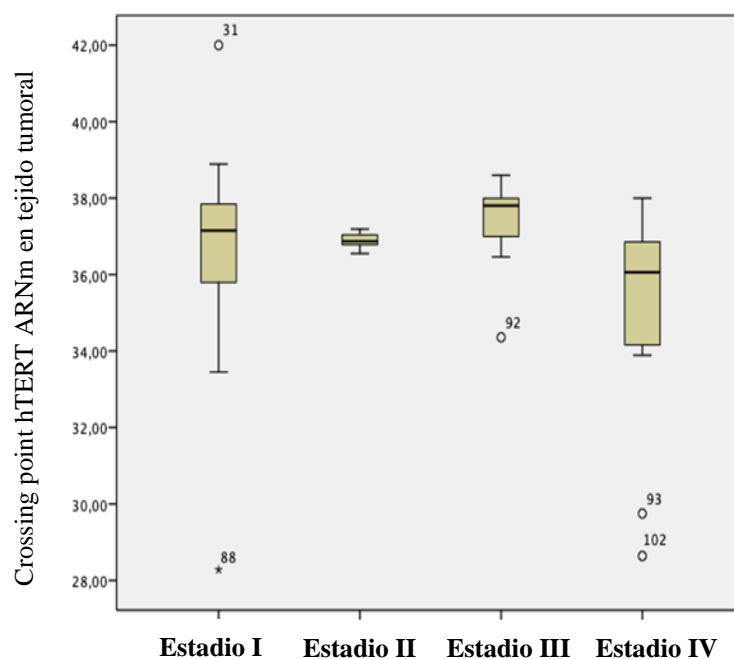


Figura 25. Crossing Point de hTERT ARNm en el tejido tumoral analizado según estadio TNM.

Todos los tumores con diferenciación sarcomatoide mostraron 3 réplicas positivas a hTERT ARNm. En el 52% de los CCRcc se detectaron 2 ó 3 réplicas de ARNm hTERT ($p=0,002$). En 1/8 oncocitomas (12,5%) se detectó expresión de ARNm hTERT en una única réplica, siendo este caso de histología mixta, con un componente asociado de histología con diferenciación sarcomatoide.

En el 80% de los casos N1 3 réplicas fueron positivas a hTERT, sin encontrar significación estadística. Respecto a las diferencias entre pacientes M0 y M1, se comprobó que los enfermos M1 con 3 réplicas positivas a hTERT ARNm representaron el 85% de los casos metastásicos, frente al 32% en sujetos M0 ($p = 0,005$).

En relación con el estadio TNM, se detectaron 3 réplicas positivas a hTERT ARNm en el 72% de los estadios IV, frente a una media de 32% en estadios TNM inferiores ($p=0,017$).

En la Tabla 8 se muestra la distribución del número de réplicas de hTERT ARNm según las distintas variables anatomopatológica del estudio.

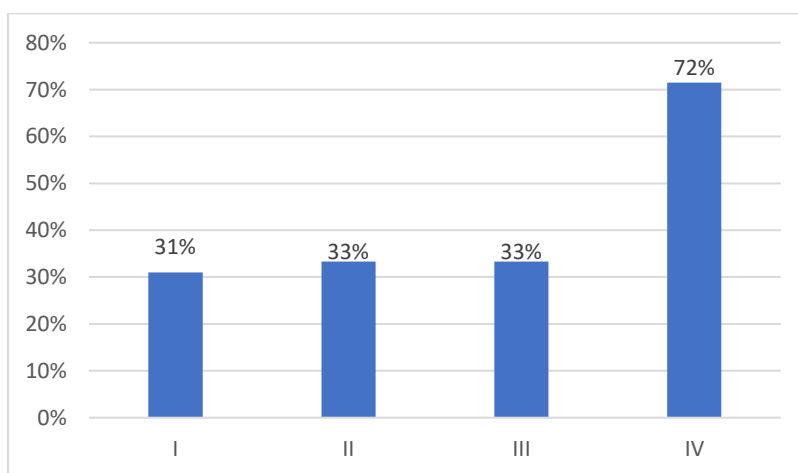


Figura 26. Detección de 3 réplicas positivas a hTERT ARNm en muestras de tejido tumoral según el estadio TNM.

Tabla 8. Número de réplicas en la expresión de hTERT ARNm en muestra de tejido CCR según las variables analizadas en el estudio.

VARIABLES		NÚMERO DE RÉPLICAS hTERT ARNm (%)				p
		0	1	2	3	
Histología	Células claras	17 (22)	20 (26)	10 (13)	30 (39)	0,002
	Papilar	4 (31)	3 (23)	0	6 (46)	
	Cromóforo	7 (64)	3 (27)	0	1 (9)	
	Dif. Sarcomatoide	0	0	0	2 (100)	
	Oncocitoma	7 (88)	1 (12)	0	0	
Grado Furhman	1	3 (44)	1 (14)	1 (14)	2 (28)	n. s.
	2	14 (30)	9 (19)	5 (11)	19 (40)	
	3	5 (19)	12 (44)	3 (11)	7 (26)	
	4	2 (17)	2 (17)	1 (8)	7 (58)	
pT	1	18 (32)	14 (24)	7 (12)	18 (32)	n. s.
	2	4 (24)	6 (38)	0	6 (38)	
	3	3 (14)	6 (27)	2 (9)	11 (50)	
	4	1 (20)	0	1 (20)	3 (60)	
N	0	24 (26)	26 (28)	10 (11)	34 (35)	n. s.
	1	1 (20)	0	0	4 (80)	
pM	0	27 (30)	25 (28)	9 (10)	29 (32)	0,005
	1	1 (8)	1 (8)	1 (8)	10 (76)	
Estadio TNM	I	19 (33)	14 (24)	7 (12)	18 (31)	0,017
	II	4 (27)	6 (39)	0	5(34)	
	III	4 (27)	5 (33)	1 (7)	5 (33)	
	IV	1 (7)	1 (7)	2 (14)	10 (72)	

4.3.- DETECCIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE ARNm EN PLASMA

4.3.1.- Detección y cuantificación de hTERT ARNm en muestra de plasma.

Se determinó en 21 casos del total de 77 muestras de ARNm analizadas, encontrando en tan solo 1 caso la presencia de hTERT ARNm en plasma (5%), por lo que se optó por no seguir con la determinación de este parámetro. Igualmente, se determinó de forma paralela en 31 controles sin detectar su presencia en ninguno de ellos.

El caso en el que se detectó hTERT ARNm correspondió a un varón de 48 años que presentaba un CCRcc metastásico T3aN0M1 - estadio TNM IV y que falleció a los pocos meses de la nefrectomía.

4.3.2. Detección y cuantificación de GAPDH ARNm en plasma.

Se detectó en todas las muestras analizadas. Es decir, en 77 casos de CCR, de forma pre- y postoperatoria, y en 55 casos en muestra de plasma al año de la nefrectomía. Igualmente, se detectó en los 31 voluntarios sanos.

4.3.2a. GAPDH ARNm en muestra de plasma preoperatoria.

Su media fue de 126,3 fg/ml (IC95%: 33,5 - 219,2; mediana: 0,16 fg/ml; DE: 390,12 rango de 5×10^{-5} - 1802,5 fg/ml). Los 31 controles presentaron unos valores medios de 22,8 fg/ml (IC95%: 11,0 - 34,6; mediana: 7,75 fg/ml; DE: 30,8; rango de 0,2 - 119,2 fg/ml). Los niveles medios de GAPDH ARNm preoperatorios fueron significativamente mayores en los pacientes con CCR en relación a los controles ($p < 0,0001$), aunque las medianas de los casos fueron significativamente inferiores a los de los controles ($p < 0,0001$).

Los niveles de GAPDH ARNm preoperatorios no siguieron una distribución normal ($Z = 3,793$; $p < 0,0001$).

Tomando como valor de referencia la media de GAPDH ARNm de los controles, un total de 12/77 (16%) de los pacientes presentaron valores superiores. El aumento o no de GAPDH ARNm prequirúrgico no se correlacionó con ninguna de las variables del estudio.

Los niveles de GAPDH ARNm prequirúrgico se correlacionaron débilmente con el diámetro del tumor ($r = 0,231$; $p = 0,05$) pero la media de GAPDH ARNm en plasma de muestras preoperatorias no se asoció significativamente con las diferentes variables clinico-patológicas del estudio.

4.3.2b. GAPDH ARNm en muestra de plasma postoperatoria.

La media de los días de postoperatorio transcurridos hasta la extracción de ésta y de todas las muestras postoperatorias de este estudio y que se detallaran en lo sucesivo, fue de 5,3 días (IC95%: 4,3 – 6,2; DE: 5,1 rango: 2 - 35 días). El rango de tiempo fue amplio, debido a la prolongada estancia de uno de los pacientes de la serie por una complicación postoperatoria. No hubo relación estadística entre el tiempo en que se obtuvo la muestra postoperatoria y los resultados de las mismas.

La media de GAPDH ARNm postnefrectomía fue de 72,4 fg/ml (IC95%: - 47,6 - 206,4; mediana: 0,15 fg/ml; DE 548,2; rango de 0 - 4700 fg/ml). Los niveles de GAPDH ARNm postnefrectomía no siguieron una distribución normal ($Z = 3,827$; $p < 0,0001$).

Tomando como valor de referencia la media de GAPDH ARNm de los controles, un total de 7/77 (9%) de los pacientes presentaban valores superiores tras la intervención. Los enfermos con metástasis al diagnóstico presentaron, en mayor proporción, valores por encima de este punto de corte en relación a pacientes no metastásicos: 43% vs 14% ($p = 0,05$).

No hubo correlación entre los niveles postoperatorios de GAPDH ARNm en plasma con los hallados en las muestras previas a la intervención ($r = 0,055$).

Tras la nefrectomía, se observó un descenso de los niveles de GAPDH ARNm en 39/77 pacientes (50,6%), si bien no hubo diferencias significativas entre los valores medios de GAPDH ARNm antes y después de la intervención.

Un 52% de los hombres aumentaron GAPDH ARNm tras la nefrectomía frente un 24% en mujeres ($p = 0,048$).

4.3.2c. GAPDH ARNm en muestra de plasma al año de la nefrectomía.

Se determinó en 55 sujetos, presentando una media de 0.16 fg/ml (IC95%: 0,1 – 0,22 fg/ml; mediana 0,08 fg/ml; DE: 0,21; rango entre 0,0001 y 0,94 fg/ml). Los niveles de GAPDH ARNm en muestra anual no siguieron una distribución normal ($Z = 1,666$; $p < 0,009$).

Hubo correlación entre los niveles de GAPDH ARNm anuales, los preoperatorios ($r = 0,253$; $p < 0,05$) y los postoperatorios ($r = 0,324$; $p < 0,011$).

Al comparar los valores de GAPDH ARNm entre muestras anuales y preoperatorias, se observó significativamente un descenso medio de 82,1 fg/ml (DE: 318,9) al año de la intervención ($p = 0,049$) y de 13,5 fg/ml (DE: 49,6) si lo comparamos con las muestras postoperatorias ($p = 0,048$), mostrando unos valores de la media ($p < 0,001$) y de la mediana ($p < 0,0001$) significativamente inferiores al año de la intervención incluso a los que presentaban los pacientes del grupo control. Un total de 23/55 pacientes (42%) aumentaron los niveles de GAPDH ARNm al año en relación a los que presentaban preoperatoriamente, disminuyéndolos 32/55 pacientes (58%). Si los comparamos con los valores postoperatorios, aumentaron las cifras de GAPDH ARNm 24/54 pacientes (44%) y lo disminuyeron 30/54 (56%). Estos cambios no se relacionaron significativamente con ninguna de las variables clínico-patológicas.

Asimismo, se observó un descenso de los niveles en muestras anuales respecto a las preoperatorias en 30/55 pacientes (55%) y en 24/55 pacientes (44%) si los comparamos con las postoperatorias. Estos cambios no se relacionaron significativamente con ninguna de las variables clínico-patológicas del estudio.

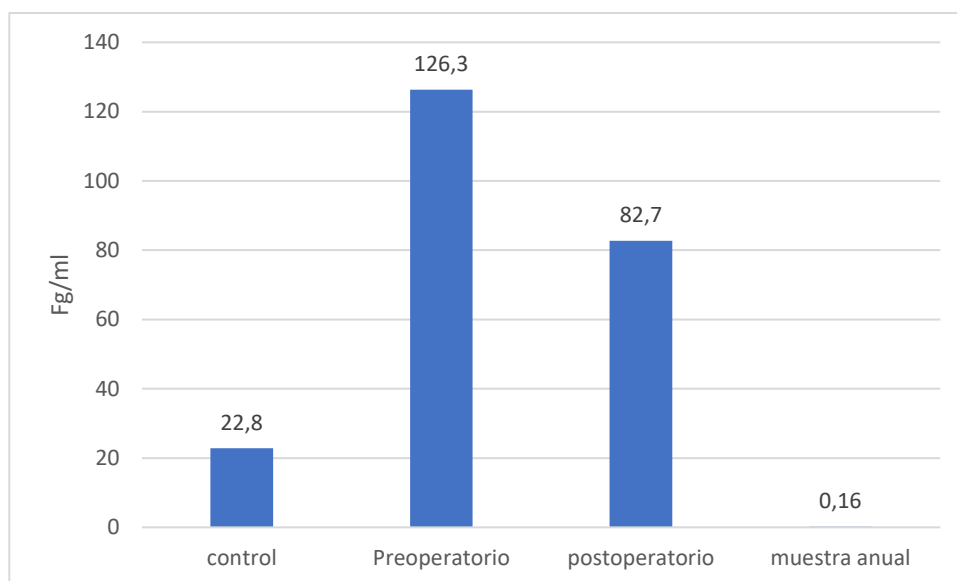


Figura 27. Representación de los valores medios de ARNm GAPDH en plasma en los diferentes momentos del estudio.

En resumen, el análisis de GAPDH ARNm en plasma dio valores significativamente más elevados en muestras preoperatorias de pacientes que en voluntarios sanos. Tras la nefrectomía estos valores disminuyeron progresivamente hasta ser inferiores, al año de la intervención, a los determinados inicialmente en sujetos sanos. Destacó especialmente la relación que la cuantificación de GAPDH ARNm pre- y postoperatoria en plasma establece con el estadio M (Tabla 17).

4.4.- DETECCIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE ADN EN PLASMA

4.4.1.- Detección y cuantificación de hTERT ADN en muestras de plasma.

4.4.1a. hTERT ADN en muestra de plasma preoperatoria.

De los 61 pacientes analizados, se detectó hTERT ADN en el plasma preoperatorio de 33 enfermos (54%) y en el resto no se pudo comprobar su presencia. Tampoco se detectó hTERT ADN en ninguno de los 22 controles.

Entre los pacientes que sí presentaron hTERT ADN plasmático preoperatorio, la media fue de 1,7 fg/ml (IC95%: 0,3 - 3,11; mediana: 0,21 fg/ml; DE 34; rango 0 - 19,1). Estos valores no siguieron una distribución normal ($Z = 1,196$; $p = 0,001$) ni se asociaron significativamente con ninguna de las variables analizadas.

Al comparar la presencia o ausencia de hTERT ADN plasmático pre-nefrectomía con las diferentes variables del estudio, se comprobó que ningún paciente con ausencia de éste progresó o falleció durante el seguimiento ($p = 0,05$). Igualmente, hubo una mayor proporción de grados de Furhman 3 y 4 entre los pacientes en que sí se detectó hTERT ADN preoperatoriamente ($p = 0,036$). Estos datos se representan en la Figura 28. El resto de datos de este apartado se detallan en la Tabla 9.

La edad de los pacientes con hTERT ADN en plasma prequirúrgico fue significativamente mayor que la de los pacientes que no lo presentaron: 63,8 (DE 12,6) vs 54,4 años (DE: 13,4; $p = 0,007$).

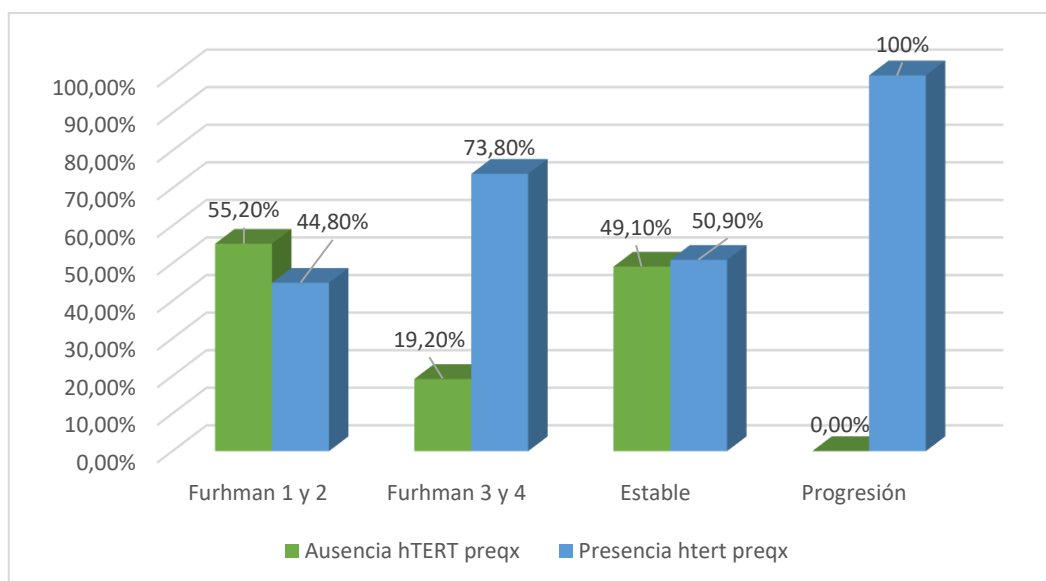


Figura 28. Relación entre la existencia o ausencia de hTERT ADN en plasma prenefrectomía con las variables grado de Furhman y progresión de enfermedad.

Tabla 9. Relación de la presencia o ausencia de ADN hTERT pre-nefrectomía en el plasma de las muestras de los pacientes con CCR con las variables analizadas en el estudio.

VARIABLES		Existencia hTERT ADN precirugía		P
		NO N (%)	SI N (%)	
Sexo	Mujer Varón	8 (44,4) 20 (51,1)	10 (56,6) 23 (48,9)	n.s.
Histología	CCRcc No CCRcc	6 (54,5) 22 (44)	5 (45,5) 28 (56)	n.s.
pT	pT1-pT2 pT3-pT4	22 (44) 6 (37,5)	28 (56) 10 (62,5)	n.s.
N	N0 N1	27 (48,2) 0 (0,0)	29 (51,8) 4 (100)	n.s.
pM	M0 M1	25 (50) 3 (27,3)	25 (50) 8 (72,7)	n.s.
Estadio TNM	I - II III- IV	20 (51,1) 8 (44,4)	23 (48,8) 10 (55,6)	n.s.
Furhman	1 - 2 3- 4	21 (55,2) 5 (19,2)	17 (44,8) 14 (73,8)	0,036
Estado actual	Estable Progresión	28 (49,1) 0 (0,0)	29 (50,9) 4 (100)	0,05
Multiplicidad	Si No	3 (60) 24 (43,6)	2 (40) 31 (56,4)	n.s.

4.4.1b. hTERT ADN en muestra de plasma postoperatoria.

Tras la cirugía el porcentaje de pacientes en los que se detectaron niveles de hTERT ADN descendió al 49% (30/61 pacientes). La media, entre los 30 enfermos que sí presentaron niveles de hTERT ADN plasmático postoperatorio, fue de 1 fg/ml (IC95%: 0,07 - 2,64; mediana: 0,028 fg/ml; DE: 3,44; rango 0,00 – 16,28). Estos valores no siguieron una distribución normal ($Z = 2,123$; $p < 0,0001$).

La detección de hTERT ADN postoperatoria se asoció con la existencia de metástasis, observando que estos enfermos presentaron valores más altos que los pacientes pM0: 2,7 fg/ml en enfermos M1 vs 0,2 en M0 ($p = 0,05$). Sin embargo, no hubo diferencias en cuanto a sus medianas.

Los niveles de hTERT ADN pre- y postoperatorios se correlacionaron entre sí ($r=0,323$; $p = 0,013$), aunque no hubo diferencias significativas entre sus medias.

Tras la intervención, 29/57 pacientes (51%) permanecieron negativos o negativizaron la detección de hTERT ADN en plasma. Los 28 pacientes restantes (49%) la positivizaron o permanecieron positivos.

El 75% de los enfermos N1 permanecieron con niveles detectables en plasma de hTERT ADN tras la cirugía ($p = 0,05$). Estos resultados se detallan en la Tabla 10. Para el resto de variables no se observaron diferencias en relación a los cambios en hTERT ADN plasmáticos tras la nefrectomía.

Tabla 10. Evolución de la detección en muestras de plasma de ADN hTERT tras la nefrectomía según el estadio N.

Cambios en detección de ADN hTERT tras nefrectomía	Estadio N		P
	N0	N1	
Permanece negativo	17 (33%)	0	0,05
Positiviza hTERT ADN	9 (17%)	0	
Negativiza hTERT ADN	10 (19%)	1 (25%)	
Permanece positivo	16 (31%)	3 (75%)	
TOTAL	100%	100%	

4.4.1c. hTERT ADN en muestra de plasma al año de la nefrectomía.

En 34 de los 53 pacientes (64%) se detectaron niveles de hTERT ADN, produciéndose un aumento no significativo del porcentaje de positividad en relación a los estudios pre- y postoperatorios. Entre los enfermos en los que se detectó hTERT ADN al año, la media fue de 2,2 fg/ml (IC95%: -0,03 - 4,5; mediana 0,46 fg/ml; DE 6,52; rango 0,01-36,8 fg/ml). Estos valores no siguieron una distribución normal ($Z = 2,204$; $p < 0,0001$).

Los niveles de hTERT ADN al año de la nefrectomía no se correlacionaron con los hallados en las muestras pre- y postoperatorias, si bien los niveles de las muestras al año fueron significativamente más elevados que los hallados tanto en las muestras pre- como en las postnefrectomía ($p = 0,002$ para ambas comparaciones).

Los valores medios de hTERT ADN al año no se relacionaron con ninguna de las diferentes variables del estudio. Sin embargo, su mediana en pacientes en estadio pT1-pT2, fue significativamente inferior a la que presentaron los pacientes en estadios pT3-pT4 ($p = 0,02$ vs $0,77$).

Respecto a los cambios en la detección de hTERT ADN al año de la cirugía en relación a los prequirúrgicos, se observó que la positivizaron 19/53 pacientes (36%) y la negativizaron 7/53 (13%).

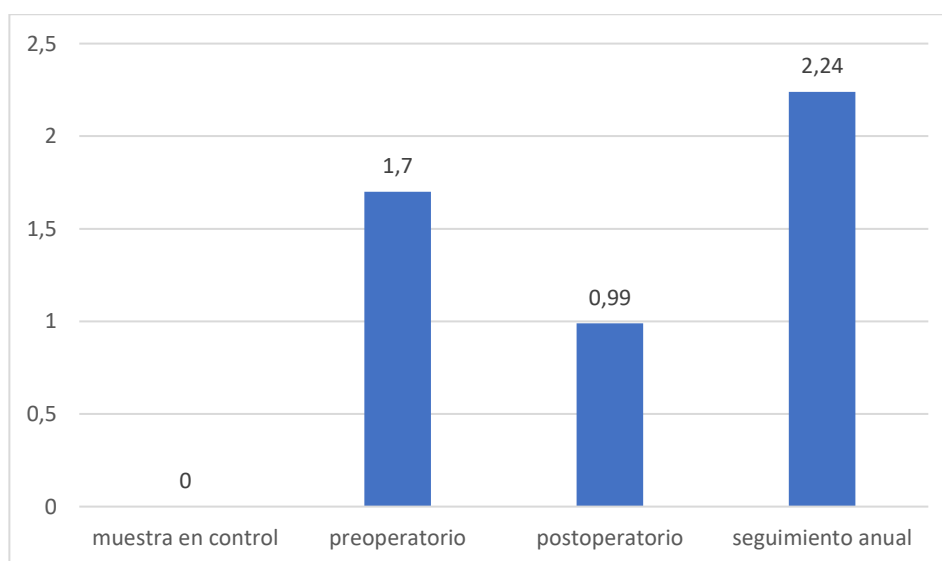
Un 57% de los pacientes que presentaron tumores con grados Furhman 3 y 4 permanecieron con niveles de hTERT ADN al año de la cirugía frente a un 17% de los grados 1 y 2. Igualmente, los tumores de grado 1 y 2 positivizaron significativamente los niveles de hTERT ADN en un 44,1%, frente a un 14,3% de los grados 3 y 4 ($p = 0,036$; Tabla 11).

Tabla 11. Cambios en los niveles de hTERT ADN en muestras de plasma prequirúrgicas vs anuales en relación con el grado de Furhman.

Cambios en detección de hTERT ADN prequirúrgico vs al año	Furhman		P
	1 y 2	3 y 4	
Permanecen negativo	7 (21%)	3 (22%)	0,036
Positivizan hTERT ADN	15 (43%)	2 (14%)	
Negativizan hTERT ADN	6 (18%)	1 (7%)	
Permanecen positivo	6 (18%)	8 (57%)	
TOTAL	100%	100%	

La detección de hTERT ADN en las muestras de plasma obtenidos en el seguimiento en relación a los postquirúrgicos se positivizó o permaneció positiva en 33/53 pacientes (62%). Estos cambios no se relacionaron con ninguna de las variables del estudio.

Una vez analizados los niveles de hTERT ADN plasmático en los diferentes momentos del estudio, se pudo comprobar que: en los controles sanos no se detectó, y que en los pacientes en que sí se detectó, los niveles de hTERT ADN se redujeron de forma no significativa en el postoperatorio inmediato y que ascendieron, también no significativamente, al año de la nefrectomía, superando incluso los valores preoperatorios (Figura 29).

**Figura 29.** Representación de los valores medios de hTERT ADN plasmático en los diferentes momentos del estudio y en voluntarios sanos.

Al analizar hTERT ADN como marcador plasmático, destaca la relación de su detección preoperatoria con la progresión de enfermedad y con los grados Furhman 3 y 4. Del mismo modo, los niveles postoperatorios se asociaron con los estadios N y M. La determinación al año de la nefrectomía también se relacionó con los grados de Furhman más elevados (Tabla 17).

4.4.2.- Detección y cuantificación de GAPDH ADN en muestras de plasma.

4.4.2a. GAPDH ADN en muestra de plasma preoperatoria.

La media de GAPDH ADN en plasma prequirúrgico fue de 7,8 fg/ml (IC95%: 2,4 - 13,3; mediana 0,91 fg/ml; DE: 21,5) con un valor mínimo de 0,03 y un máximo de 106,2 fg/ml. Este valor fue significativamente mayor al que presentaron los 22 sujetos del grupo control: 1,3 fg/ml (IC95%: -1,0 - 3,7; $p < 0,001$). Los valores de GAPDH ADN preoperatorios no siguieron una distribución normal ($Z = 3,042$; $p < 0,0001$). Se objetivó una diferencia significativa entre los valores de las medianas de GAPDH ADN entre las muestras preoperatorias y las de los controles ($p = 0,0001$).

Tomando como referencia el valor medio de GAPDH ADN en los controles, 23/61 pacientes (38%) presentaron valores por encima de este punto de corte antes de la intervención. Las mujeres presentaron en mayor proporción valores por encima del punto de corte (39%) mientras que los hombres se mantuvieron mayoritariamente con valores por debajo (79%; $p = 0,05$). De igual forma, la proporción de tumores en estadios pT3-pT4 con valores aumentados de GAPDH ADN al diagnóstico fue del 39%, superior al 8% de estadios altos con valores normales. Este dato estuvo cercano a alcanzar significación estadística ($p = 0,06$).

Hubo una correlación positiva entre los niveles de GAPDH ARNm y ADN antes de la intervención ($r = 0,295$; $p = 0,007$). También se correlacionaron, débilmente, con los valores de hTERT ADN preoperatorios ($r = 0,260$; $p = 0,041$).

Al relacionar los valores medios de GAPDH ADN con las diferentes variables del estudio, se observó que fueron significativamente más elevadas en estadios pT3-T4 ($p = 0,041$) y III/IV ($p = 0,044$) respecto a los estadios inferiores. Lo mismo ocurrió con los enfermos con metástasis al diagnóstico ($p = 0,05$) y en los que habían progresado o

fallecido a la finalización del estudio ($p = 0,033$.; Figura 30). La Tabla 12 detalla todos estos datos. Sin embargo, no se observaron diferencias significativas en las medianas de GAPDH ADN en relación a ninguna de las variables del estudio.

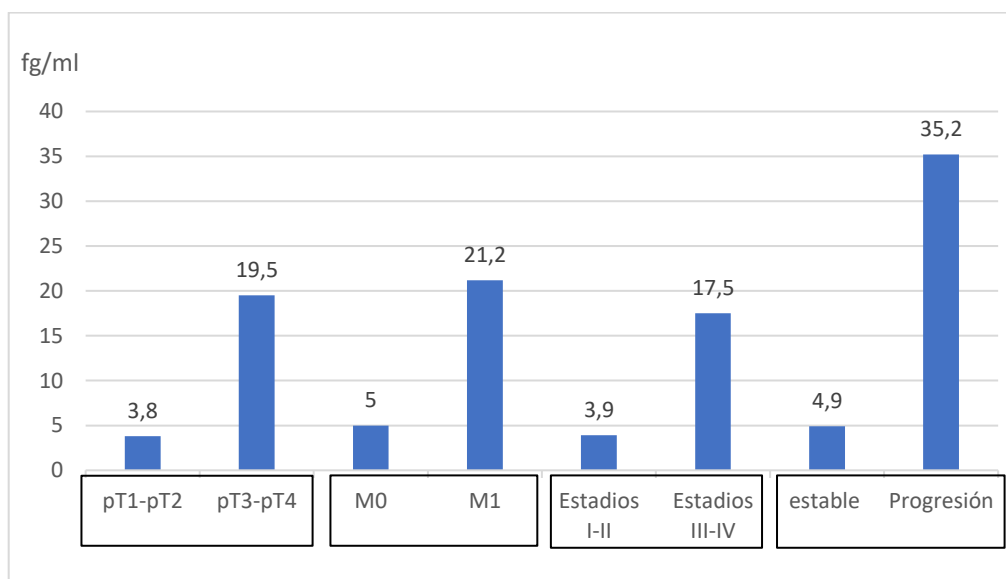


Figura 30. Comparación de los niveles de GAPDH ADN en muestras de plasma preoperatorio en las diferentes variables clínico-patológicas analizadas en el estudio.

Tabla 12. Distribución de media e IC95% de GAPDH ADN en muestras de plasma preoperatorio según las diferentes variables clínico-patológicas analizadas en el estudio.

VARIABLES		MEDIA fg/ml	IC95%	p
Sexo	Mujer	12,0	-1,8 - 25,7	n.s.
	Varón	6,2	0,6 - 11,7	
Histología	CCRcc	9,1	2,5 -15,7	n.s.
	No CCRcc	2,2	-0,1 - 6,4	
pT	pT1 - pT2	3,8	0,4 -7,2	0,044
	pT3 - pT4	19,5	0,3 - 38,8	
N	N0	6,72	1,8 - 11,8	n.s.
	N1	25,5	-52,1 – 103,2	
pM	M0	5,0	1,1 - 8,6	0,05
	M1	21,2	-6,0 – 48,5	
Estadio TNM	I - II	3,9	0,4 - 7,4	0,041
	III- IV	17,5	0,4 - 34,6	
Furhman	I – II	4.4	0,9 - 8,0	n.s.
	III - IV	15.7	-0,2 -31,7	
Estado actual	Estable	4,9	1,4 – 8,5	0,033
	Progresión	35,3	-19,3 – 90,0	
Multiplicidad	Si	2,2	-0,7 – 5,1	n.s.
	No	8,5	2,5 - 14,4	

4.4.2b. GAPDH ADN en muestras de plasma postoperatorio.

La media de GAPDH ADN en estas muestras fue de 12,8 fg/ml (IC95%: 4,9 - 20,5; mediana 1,8 fg/ml; DE 30,4; Rango 0,02 -146,5 fg/ml). Los valores no siguieron una distribución normal ($Z = 2,63$; $p < 0,005$).

Tomando como referencia el valor medio de GAPDH ADN encontrado en los controles, 37/61 pacientes (60,7%) presentaron valores por encima de este punto de corte tras la nefrectomía.

Los niveles de GAPDH ADN postoperatorios fueron significativamente más altos que los encontrados en las determinaciones prequirúrgicas, con una diferencia de medias pre- y postoperatorias de 4,1 fg/ml (DE: 2,0; $p = 0,019$).

Los valores de GAPDH ADN pre- y postquirúrgicos se correlacionaron en sentido positivo ($r = 0,875$; $p < 0,001$).

La comparación de los valores de GAPDH ADN plasmático postnecrectomía con el resto de variables del estudio, demostró un patrón similar al observado con los valores preoperatorios de GAPDH ADN, aunque no se llegó a alcanzar significación estadística en ninguno de los casos. Tampoco se objetivaron diferencias significativas entre las medianas de GAPDH ADN tras la nefrectomía.

Tras la intervención, 49/61 pacientes (80%) aumentaron sus niveles plasmáticos de GAPDH ADN, disminuyendo en el resto (12/61 pacientes; 20%). La variación de GAPDH ADN tras la nefrectomía (aumento o descenso) no se correlacionó con ninguna de las variables analizadas.

4.4.2c. GAPDH ADN en muestra de plasma al año de la nefrectomía.

La media de GAPDH ADN plasmático al año de la cirugía fue de 3,0 fg/ml (IC95% 0,2 - 5,8; mediana; 0,58 fg/ml; DE: 10,4; rango 0 – 63,25 fg/ml). Los valores de GAPDH ADN en muestra al año de la cirugía no siguieron una distribución normal ($Z = 3,100$; $p < 0,0001$).

Según el valor medio de GAPDH ADN de los controles, 16/54 pacientes (30%) presentaron valores por encima de este punto al año de la intervención. El porcentaje de pacientes metastásicos con valores elevados fue del 29% frente a un 8% de pacientes pM1 con valores por debajo del punto de corte establecido. Este dato estuvo cerca de alcanzar significación estadística ($p = 0,08$).

Los enfermos que presentaban datos de progresión de su enfermedad, tuvieron, al año de la nefrectomía, valores por encima del punto de corte en mayor proporción (12,5%), no existiendo ningún enfermo con progresión con valores por debajo del corte ($p = 0,026$).

Los valores al año de la intervención de GAPDH ADN se correlacionaron con los prequirúrgicos ($r = 0,450$; $p = 0,001$) y con los postquirúrgicos ($r = 0,579$; $p < 0,0001$) pero no lo hicieron con los de hTERT ADN ni GAPDH ARNm determinados al año de la nefrectomía.

Los valores medios plasmáticos de GAPDH ADN detectados al año de la intervención fueron significativamente más altos en los pacientes con CCRcc que en el

resto de tipos histológicos ($p = 0,003$). Igual ocurrió con los valores de las medianas: en pacientes no CCRcc fue 0,16 fg/ml vs 0,77 fg/ml en CCRcc ($p = 0,014$) Estos valores y los relacionados con el resto de variables del estudio, se detallan en la Tabla 13.

Tabla 13: Niveles medios de ADN GAPDH en muestra de plasma al año de la nefrectomía en función de las diferentes variables del estudio.

VARIABLES		MEDIA fg/ml	IC95%	p
Sexo	Mujer	1,3	0,6 - 1,9	n.s.
	Varón	3,6	-0,5 - 8,6	
Histología	CCRcc	3,6	0,1 - 7,1	0,003
	No CCRcc	0,5	-0,1 - 1,2	
pT	pT1-pT2	3,4	-0,2 - 7,1	n.s.
	pT3-pT4	1,6	0,1 - 3,1	
N	N0	3,1	-0,0 - 6,7	n.s.
	N1	1,5	-14,0 - 17,0	
pM	M0	3,2	-0,1 - 7,0	n.s.
	M1	1,6	-0,6 - 3,0	
Estadio TNM	I-II	3,4	-0,2 - 7,5	n.s.
	III-IV	1,6	0,5 - 2,0	
Furhman	1-2	2,9	-0,9 - 6,8	n.s.
	3-4	3,8	-2,9 - 11,8	
Multiplicidad	Si	3,1	-0,9 - 4,5	n.s.
	No	1,3	-0,1 - 6,9	
Estado actual	Estable	3,0	0,0 - 6,0	n.s.
	Progresión	3,1	1,3 - 4,8	

No hubo diferencias significativas entre los niveles de GAPDH ADN plasmático obtenidos al año de la intervención quirúrgica y los prequirúrgicos, pero si se observó que, en comparación con los datos postnefrectomía, se produjo un descenso medio de 4,1 fg/ml (IC95%: 0,2-7,9; $p = 0,041$).

En la figura 31 se muestran los niveles medios de GAPDH ADN en los controles y en los pacientes durante los diferentes momentos del estudio. Puede comprobarse que los pacientes con tumor renal presentaron niveles superiores a los encontrados en controles sanos, y que se elevaron en el postoperatorio inmediato, normalizándose estos valores al año de seguimiento hasta ser casi equiparables con los de los controles, si bien siguieron siendo algo superiores a los mismos.

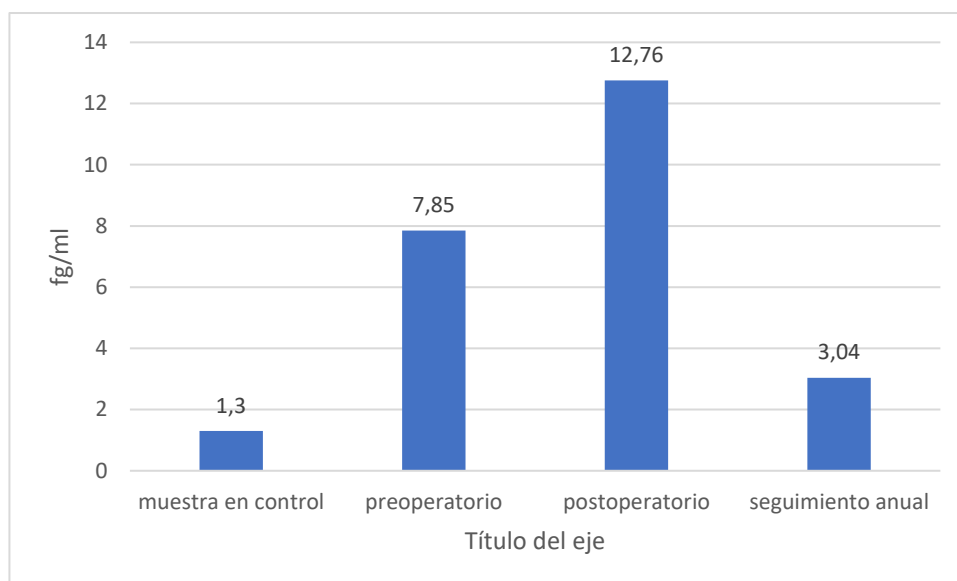


Figura 31. Representación de los niveles medios de GAPDH ADN en muestras plasmáticas en los diferentes momentos del estudio.

En relación a los valores preoperatorios, un 51,9% de los pacientes disminuyeron sus cifras al año de seguimiento (28/54), mientras que, en relación a los postoperatorios, esta disminución fue del 68,5% (37/54 sujetos).

Los cambios en los niveles de GAPDH ADN plasmático al año de la nefrectomía en relación a los preoperatorios no demostraron diferencias significativas con las diferentes variables del estudio, con la salvedad de que la edad media de los pacientes que aumentaron sus niveles respecto a la preoperatoria fue significativamente inferior que la de aquellos que descendieron sus niveles (55,49 años *vs* 62,89; $p = 0,005$).

Las modificaciones en los niveles de GAPDH ADN al año con respecto a los postnefrectomía, demostró que el 100% de los pacientes que disminuyeron sus niveles al año de la cirugía permanecían estables ($p = 0,028$; Tabla 13), y que los pacientes que los aumentaron tenían tumores de mayor tamaño que los que descendieron sus niveles (7,2 cm *vs* 5,0 cm; $p = 0,017$).

Tabla 14: Modificación en los niveles de ADN GAPDH en muestras de plasma postoperatorias y al año de la nefrectomía

CAMBIOS EN LOS NIVELES DE ADN GAPDH POSTQUIRÚRGICO Y AL AÑO DE LA NEFRECTOMÍA				
VARIABLES		BAJAN N (%)	SUBEN N (%)	p
Sexo	Mujer	8 (21,6)	6 (37,5)	n.s.
	Varón	29 (78,4)	10 (62,5)	
Histología	CCRcc	29 (78,4)	14 (87,5)	n.s.
	No CCRcc	8 (21,6)	2 (12,5)	
pT	pT1-pT2	29 (78,4)	12 (75)	n.s.
	pT3-pT4	8 (21,6)	4 (25,0)	
N	N0	35 (97,2)	15 (93,8)	n.s.
	N1	1 (2,8)	1 (6,3)	
pM	M0	34 (91,9)	12 (75)	n.s.
	M1	3 (8,1)	4 (25)	
Estadio TNM	I-II	28 (75,7)	11 (68,8)	n.s.
	III-IV	9 (24,3)	5 (31,3)	
Furhman	1-2	21(61,8)	13 (86,7)	nos
	3-4	13 (38,2)	2 (13,3)	
Multiplicidad	Si	2 (5,4)	2 (13,3)	n.s.
	No	35 (94,6)	13 (86,7)	
Estado actual	Estable	37 (100)	14 (87,5)	0,028
	Progresión	0 (0,0)	2 (12,5)	

El análisis cuantitativo de GAPDH ADN como marcador en plasma se asocia, tanto pre- como postoperatoriamente, con los estadios T, M y TNM, así como con la progresión clínica. Igualmente, su determinación durante el seguimiento (muestra anual) se asocia con el subtipo histológico de células claras (CCRcc), el estadio M y la progresión clínica (Tabla 17).

4.4.3.- Detección y cuantificación alternativa de ADN total en muestras de plasma.

4.4.3a. ADN total en muestra prequirúrgica.

Los niveles plasmáticos de ADN total preoperatorios fueron significativamente más altos en los pacientes con tumor renal (media: 12358 copias/μl; IC95%: 3892-31402; mediana: 4290 copias/μl; DE 31448,05; Rango: 88,9 - 218000) que en los sujetos control (media 3273,36 copias/μl; IC95% 1611- 4935; mediana 2165 copias/μl; DE 3748,51; rango 2 - 13498 copias/μl; p = 0,01). Sin embargo, no se encontraron diferencias significativas

en cuanto a los valores de las medianas entre los niveles preoperatorios y los de los controles ($p = \text{n.s.}$). La muestra no siguió una distribución normal ($Z = 3,061$; $p < 0,0001$).

Tomando como referencia la media de ADN total de los controles, 32/54 pacientes (59,3%), presentaron aumentados sus niveles antes de la intervención.

La media y la mediana de ADN total no mostraron asociación estadísticamente significativa con ninguna de las variables del estudio, aunque sí hubo una débil correlación con el diámetro tumoral ($r = 0,285$; $p = 0,04$).

Los niveles de ADN total plasmático prequirúrgico se correlacionaron fuertemente con los niveles de GAPDH ADN ($r = 0,715$; $p < 0,0001$) pero no con los de hTERT ADN.

4.4.3b. ADN total en muestra postoperatoria.

La media de ADN plasmático total tras la nefrectomía fue de 28170 copias/ μl (IC95%: 16593 - 39747; mediana: 151000 copias/ μl ; DE 41548,7; rango 288 - 219000 copias/ μl).

Tomando como referencia la media de ADN total de los controles, 46/54 pacientes (85,2%), tenían aumentados sus niveles después de la intervención.

Al comparar los datos de ADN total pre- y postoperatorios, se observó un ascenso medio de 15523,4 copias/ μl tras la intervención ($p < 0,0001$), aumentando sus niveles el 88,5% de los pacientes.

Las diferentes variables analizadas en el estudio no se asociaron con los niveles medios, ni las medianas de ADN total tras la nefrectomía.

Al igual que ocurrió con la valoración antes de la cirugía, los niveles de ADN plasmático total postoperatorios se correlacionaron con los de GAPDH ADN postoperatorios ($r = 0,375$; $p < 0,007$), pero no con los de hTERT ADN postcirugía. Los valores de ADN total pre- y postcirugía no se correlacionaron entre sí.

4.4.3c. ADN total en muestra al año de la nefrectomía.

La media de ADN total en la muestra de plasma obtenida en el seguimiento fue de 10412,60 copias/ μl (IC95%: 5916,6 – 14908,6 copias/ μl ; DE: 15819; mediana 4525

copias/ μ l; rango 43,3 – 79100 copias/ μ l). Estos valores no siguieron una distribución normal ($Z = 2,019$; $p = 0,001$).

Tomando como referencia la media de ADN total de los controles, 31/50 pacientes (62,0%) presentaron aumentados sus niveles al año de seguimiento

Al analizar la relación entre ADN total al año de la cirugía con las diferentes variables analizadas, únicamente se observó que los pacientes que permanecían estables durante el seguimiento presentaron significativamente valores medios inferiores a los de pacientes que habían progresado ($p = 0,05$). Estos resultados se detallan en la Tabla 15. No hubo diferencias significativas en relación a los valores de las medianas. Los valores de ADN plasmático total en el seguimiento no se correlacionaron con los preoperatorios ni con los de seguimiento de GAPDH ADN y hTERT ADN.

Al analizar las diferencias entre los valores de ADN total en plasma entre muestras preoperatoria y al año de la intervención, no se observaron diferencias estadísticamente significativas.

Tabla 15: Representación de valores medios de ADN plasmático total en muestra de seguimiento según las diferentes variables clínico-patológicas analizadas.

VARIABLES		MEDIA (copias/ μ l)	IC95%	p
SEXO	Mujer	5693,8	2878 - 7141	n.s.
	Varón	12070,5	5549 - 18140	
Histología	CCRcc	9461,1	5213 - 158885	n.s.
	No CCRcc	24774,0	-3753 - 18145	
pT	pT1-pT2	9816,2	3752 - 14523	n.s.
	pT3-pT4	12798,3	2198 - 26601	
N	N0	10614,5	5177 - 15139	n.s.
	N1	10578,0	-120575 - 141731	
pM	M0	8434,5	4848 - 12812	n.s.
	M1	22563,7	-20779 - 62638	
Estadio TNM	I – II	9675,4	4435 - 15406	n.s.
	III- IV	12746,9	-699 - 23420	
Furhman	1 – 2	10899,4	4835 - 17308	n.s.
	3- 4	8026,5	1152 - 14058	
Estado actual	Estable	9737,0	580 -14973	0,05
	Progresión	26650,0	11253 - 39541	
Multiplicidad	Si	22015,0	-47400 - 103893	n.s.
	No	9312,7	4449 - 13233	

Un total de 26 de 50 pacientes (52%) disminuyeron los niveles de ADN total al año de la nefrectomía en relación a los obtenidos en el preoperatorio. De forma significativa, un 58% de los enfermos en estadio M0 disminuyeron los niveles de ADN total en relación a los niveles preoperatorios, por tan solo un 14% de los enfermos metastásicos, que aumentaron los niveles de ADN total anual en un 85% ($p = 0,031$).

Al comparar los niveles de ADN total postoperatorios con los de seguimiento, se demostró una disminución significativa, descendiendo una media de 18413,49 copias/ μ l (IC95%: 7795,11- 29031) ($p = 0,0001$). Los niveles de ADN total postquirúrgicos y anuales se correlacionaron entre sí ($r = 0,479$; $p = 0,001$).

Al año de la nefrectomía, 45/50 (90%) pacientes disminuyeron los niveles de ADN total en relación a los postoperatorios. Significativamente el 91% de los pacientes que descendieron los valores de ADN total al año en relación a los postnefrectomía, estaban libres de metástasis (pM0), mientras que un 60% de los enfermos que los aumentaron eran pM1 ($p = 0,016$). De igual forma, el 80% de pacientes que los disminuyeron eran estadios TNM I y II, mientras que el 60% de los que los elevaron eran estadios III y IV ($p = 0,047$). Finalmente, el 2% de los pacientes cuyos niveles descendieron habían progresado, frente a un 20% de aumento en enfermos que habían progresado o fallecido durante el seguimiento ($p < 0,05$). El resto de resultados se enumeran en la Tabla 16.

Tabla 16. Modificación de los niveles de ADN total en muestras de plasma postoperatorias vs muestra de seguimiento.

CAMBIOS EN LOS NIVELES DE ADN TOTAL POSTQUIRURGICO Y AL AÑO DE LA NEFRECTOMÍA				
VARIABLES		BAJAN N (%)	SUBEN N (%)	p
Sexo	Mujer	12 (26,7)	1 (20)	n.s.
	Varón	33 (73,3)	4 (80)	
Histología	CCRcc	37 (82,2)	4 (80)	n.s.
	No CCRcc	8 (17,8)	1 (20)	
pT	pT1-pT2	37 (82,2)	3 (60)	n.s.
	pT3-pT4	8 (17,8)	2 (40)	
N	N0	43 (97,7)	4 (80)	n.s.
	N1	1 (2,3)	1 (20)	
pM	M0	41 (91,2)	2 (40)	0,016
	M1	4 (8,9)	3 (60)	
Estadio TNM	I-II	36 (80)	2 (40)	0,047
	III-IV	9 (20)	3 (60)	
Furhman	1-2	31 (73,8)	2 (40)	n.s.
	3-4	1 (26,2)	3 (60)	
Multiplicidad	Si	3 (6,7)	1 (25)	n.s.
	No	42 (93,3)	3 (7)	
Afectación de bordes quirúrgicos	Si	1 (3,8)	1 (13)	n.s.
	No	24 (96,2)	26 (87)	
Estado actual	Estable	44 (97,8)	4 (80)	<0,05
	Progresión	1(2,2)	1 (20)	

En resumen, una vez analizados los niveles de ADN total en plasma en los diferentes puntos de nuestro estudio (prequirúrgicos, postnefrectomía y al año de la cirugía) y comparados con los controles sanos, observamos que en los pacientes con tumor renal los niveles en plasma de ADN total son superiores a los hallados en controles sanos, elevándose en el postoperatorio inmediato y reduciéndose al año a niveles inferiores a las muestras prequirúrgicas pero persisten por encima de los valores de los controles (Figura 32).

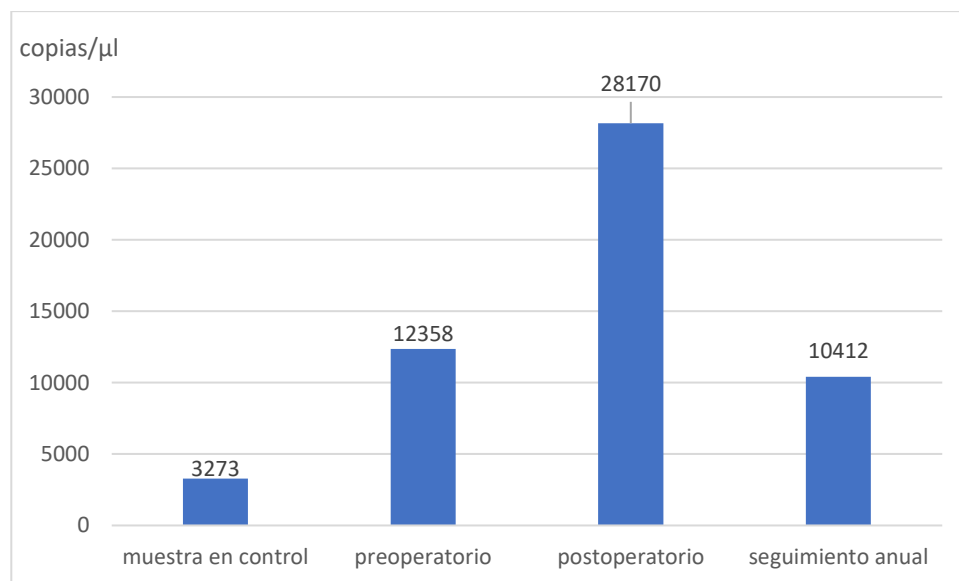


Figura 32. Cambios en los niveles de ADN total en muestra de plasma en controles y en los diferentes momentos analizados en el estudio.

Al analizar la detección alternativa de ADN total como marcador plasmático destaca su asociación con los estadios T, M y TNM, al igual que con la progresión clínica, siendo estos hallazgos superponibles a los encontrados en el análisis de GAPDH ADN plasmático (Tabla 17).

Tabla 17. Asociación estadística de los diferentes marcadores estudiados con las variables anatomopatológicas y clínicas analizadas.

MARCADOR EN PLASMA	PUNTO ESTUDIO	Histología	T	N	M	TNM	Furhman	Progresión clínica
hTERT ADN	preQx	-	-	-	-	-	+	+
	PostQx	-	-	+	+	-	-	-
	Seguimiento	-	-	-	-	-	+	-
GAPDH ADN	preQx	-	+	-	+	+	-	+
	PostQx	-	+	-	+	+	-	+
	Seguimiento	+ CCRcc	-	-	+	-	-	+
Detección alternativa de ADN	preQx	-	+	-	-	+	-	+
	PostQx	-	+	-	-	+	-	+
	Seguimiento	-	-	-	+	-	-	+
hTERT ARNm	No se detecta							
GAPDH ARNm	preQx	-	-	-	+	-	-	+
	PostQx	-	-	-	+	-	-	+
	Seguimiento	-	-	-	-	-	-	-

4.5.- RENDIMIENTO DIAGNÓSTICO DE LA CUANTIFICACIÓN DE ADN Y ARNm EN PLASMA

4.5.1.- Análisis de las curvas ROC.

Para el análisis de la exactitud diagnóstica de los marcadores utilizados en la predicción de progresión y mortalidad, se calcularon las curvas ROC para cada uno de estos marcadores. En la Tabla 18 se muestran los valores de las áreas bajo la curva (AUC) de todos ellos. Significativamente, el valor de GAPDH ADN plasmático de un paciente que progresa durante el seguimiento tiene una probabilidad del 92,2% de ser más alto que el de uno que permanece estable ($p = 0,045$) (Figura 33); y el valor de GAPDH ARNm postoperatorio de un paciente que progresa tiene un 91,3% de ser más alto que el de uno que permanece estable ($p = 0,049$; Figura 34). En este mismo sentido, estuvieron cerca de alcanzar significación estadística los valores de ADN total al año y GAPDH ARNm prequirúrgico ($p = 0,06$; Tabla 18).

Tabla 18. Valores de las áreas bajo la curva (ROC) de los diferentes biomarcadores analizados.

	SUPERVIVENCIA O PROGRESIÓN		
	AUC*	IC95%	p
GAPDH ADN			
Prequirúrgico	0,608	0,423 – 0,793	n.s.
Postquirúrgico	0,578	0,341 – 0,86	n.s.
Anual	0,922	0,848 – 0,945	0,045
hTERT ADN			
Prequirúrgico	0,647	0,448 – 0,845	n.s.
Postquirúrgico	0,673	0,483 – 0,863	n.s.
Anual	0,636	0,472 – 0,800	n.s.
ADN total			
Prequirúrgico	0,479	0,141 – 0,817	n.s.
Postquirúrgico	0,563	0,199 – 0,926	n.s.
Anual	0,896	0,779 – 1,000	n.s.
GAPDH ARNm			
Prequirúrgico	0,894	0,733 – 1,000	n.s.
Postquirúrgico	0,913	0,817 – 1,000	0,049
Anual	0,760	0,416 – 1,000	n.s.

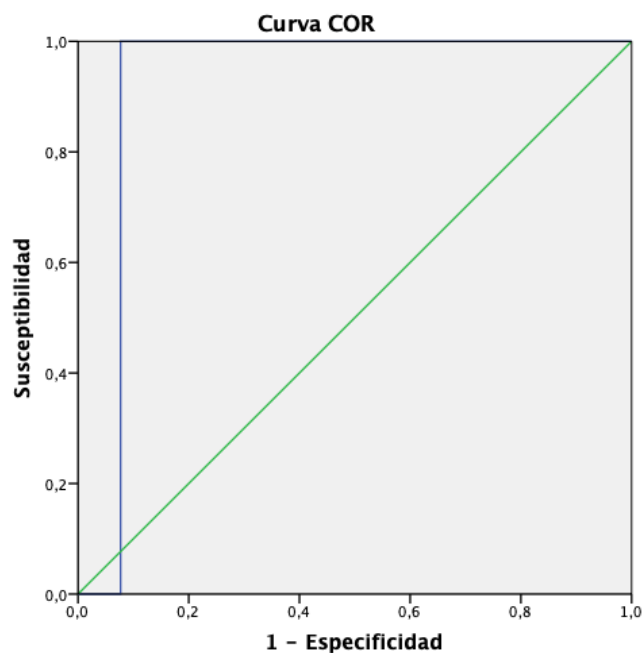


Figura 33. Curva ROC. Rentabilidad de los valores de GAPDH ADN al año de seguimiento, en el diagnóstico de progresión o exitus de los pacientes del estudio.

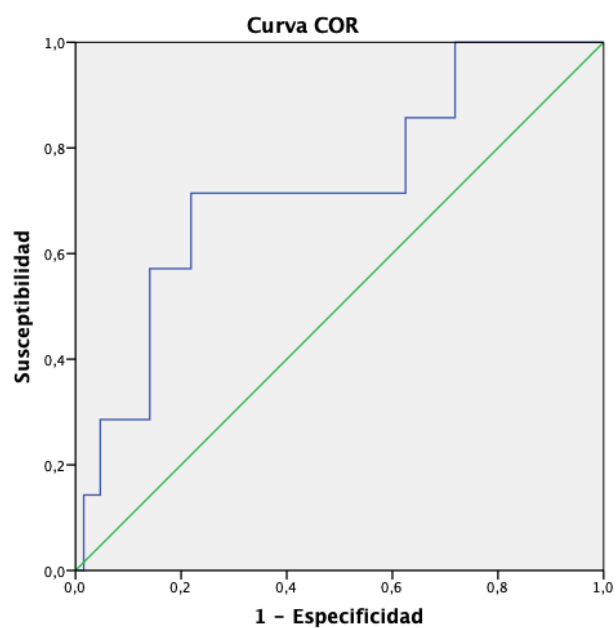


Figura 34. Curva ROC. Rentabilidad de los valores de GAPDH ARNm postoperatorio, en el diagnóstico de progresión o exitus de los pacientes del estudio

4.5.2.- Análisis de la sensibilidad y especificidad.

Se calcularon los valores de especificidad y sensibilidad para los puntos de corte óptimos de las determinaciones que mostraron significación estadística en el análisis de las curvas ROC, es decir: GAPDH ADN plasmático en el seguimiento y GAPDH ARNm plasmático postoperatorio.

Para el primero, el punto de corte óptimo fue 8,3 fg/ml (calculado para una prevalencia de 14%). Para este punto de corte, esta determinación muestra una sensibilidad del 33,3%, una especificidad del 94,4%, una eficacia global del 92,4% y un valor predictivo positivo del 100% y negativo del 90,2%.

Para GAPDH ARNm postoperatorio, el punto de corte óptimo fue 0,007 fg/ml (calculado para una prevalencia del 12%). Para este punto de corte, esta determinación muestra una sensibilidad del 50%, una especificidad del 100%, con una eficacia global del 92,4% y un valor predictivo positivo del 80% y negativo del 93,5%.

5. DISCUSIÓN

5.1 COMENTARIOS AL MÉTODO

5.1.1 Características de las poblaciones del estudio.

5.1.1a. Pacientes del grupo control.

El grupo control estuvo formado por sujetos sanos, acompañantes de pacientes pertenecientes a una consulta externa de una especialidad diferente y en los que se comprobó, tras entrevistarnos con ellos, la ausencia de antecedentes de enfermedad oncológica. Este grupo se reclutó, tras otorgar su consentimiento, de forma consecutiva y sin asignación aleatoria, pese a ello, no hubo diferencias significativas en cuanto a la edad y el sexo con los pacientes que formaban el grupo de estudio.

5.1.1b. Pacientes con carcinoma de células renales.

Los datos demográficos de la muestra del estudio son comparables en cuanto a sexo con los descritos para la demografía del CCR en las diferentes series de la literatura,⁽¹⁻³⁾ aunque la edad media de nuestros pacientes fue, ligeramente inferior (60,7 años) a la referenciada. ⁽¹⁾

Destaca, como viene siendo conocido,⁽⁵⁾ que la presentación clínica más frecuente fue su hallazgo incidental durante exploraciones radiológicas indicadas por otros motivos, lo cual hace que los datos clínicos clásicos de presentación de CCR (hematuria, dolor y/o masa abdominal) sean en la actualidad anecdóticos.

La nefrectomía radical fue el tipo de intervención más utilizado, predominando el abordaje por lumbotomía (35%) sobre el laparoscópico (30,8%), procedimiento que ha ido aumentando en su utilización en el Servicio de Urología de la GAI de Albacete durante los últimos años. Actualmente, la literatura,⁽⁶⁹⁾ manifiesta una predilección por la vía laparoscópica, estando condicionada su indicación por diversos factores como la presencia de intervenciones quirúrgicas previas, problemas médicos del paciente o la experiencia del cirujano. Igualmente, la cirugía parcial o conservadora de nefronas, nefrectomía parcial o tumorectomías abiertas o por laparoscopia, representó el 21% del total de las intervenciones. Su indicación se realiza en función de las características del paciente, estadio clínico T y la situación anatómica de la lesión. Aunque es un

procedimiento cada vez más en auge, unas tasas del 20% de nefrectomías parciales,⁽⁷⁰⁾ hace que todavía se considere que esta técnica está infrautilizada a nivel global.

Respecto a la histopatología, nuestra serie presentó mayoritariamente lesiones de estadio TNM I, con grados de diferenciación nuclear de Furhman bajos (1 y 2) y un 12,5% de pacientes metastásicos al diagnóstico, datos en la línea de lo publicado en grandes series.⁽¹⁾ Respecto a la distribución de los diferentes subtipos histológicos, nuestros hallazgos también están en consonancia con datos globales, predominando los CCRcc, seguido por CCR papilar y cromóforo.^(1-3, 5) En nuestra serie, debido al bajo número de casos con CCR papilar, decidimos incluirlos todos ellos como un mismo grupo de diagnóstico histológico, sin diferenciar entre CCR papilar tipo I o II.

El seguimiento medio de nuestros pacientes fue de 21,6 meses, con bajas tasas de mortalidad y progresión clínica, siendo lo esperable en una serie de diagnóstico mayoritariamente incidental, con lesiones de tamaño medio, y con una mayoría de pacientes con tumores órgano-confinados y de bajo grado. Nuestro tiempo de seguimiento es corto para el análisis de factores pronósticos ya que, como es conocido,^(1, 6, 9) no es infrecuente la existencia de progresión muchos años después del tratamiento. El diseño de este estudio no está planteado para un análisis a medio o largo plazo. Sin duda, una revisión de la evolución de los pacientes en el tiempo podrá proporcionar datos más fidedignos respecto a la evolución. La bibliografía muestra datos muy dispares respecto a seguimiento, mortalidad y progresión clínica, ya que las series publicadas son muy heterogéneas, lo que dificulta la comparación en este aspecto.^(1, 4, 5)

5.1.2 Comentario al método de laboratorio.

5.1.2a. Elección de ARNm y ADN plasmáticos como biomarcadores en CCR.

Dado que tanto ADN como ARN se pueden detectar a nivel extracelular y que ambos tienen un potencial papel en el diagnóstico no invasivo de diferentes patologías, incluida la enfermedad tumoral, nos planteamos como objetivo de este estudio evaluar la utilidad clínica de la detección y cuantificación de estas moléculas en el plasma de pacientes intervenidos por CCR, tanto como herramienta diagnóstica como para evaluar su correlación con las diferentes variables clínico-patológicas. Para el caso concreto de

CCR, conocíamos previamente, por los aportes bibliográficos, la relación existente entre la expresión de la telomerasa en el tejido renal y la carcinogénesis (Tabla 19). En este estudio hemos analizado la relación entre expresión de telomerasa y cáncer renal, mediante el procesado de muestras de tejido tumoral y de muestras de tejido sano adyacente al tumor (tras confirmar histológicamente la ausencia de tumor en ellas), determinando en ambas, mediante PCR-RT, la presencia de hTERT ARNm y GAPDH ARNm. En este análisis se registró el resultado tanto en número de réplicas como en Cp, siendo éste el ciclo umbral; es decir, el número de ciclo a partir del cual se detecta fluorescencia en ascensión exponencial en el sistema *Lightcycler*[®]. Igualmente se ha determinado y cuantificado en plasma hTERT ADN y GAPDH ADN.

Además, hemos añadido un método adicional como detección alternativa de ADN libre circulante, utilizando un *kit* comercial, que codifica la detección de 5 genes constitutivos.

Tabla 19: Resumen bibliográfico sobre la actividad telomerasa en cáncer renal.

Primer autor	Año	Aporte
Mehle ⁽⁷¹⁾	1996	Activación de la telomerasa de forma precoz en la progresión tumoral de CCR.
Bryan ⁽⁷²⁾	1997	Defiende la existencia de vía ALT en subgrupos de pacientes sin actividad telomerasa.
Rohde ⁽⁷³⁾	1998	Determina actividad telomerasa en el 75% de su serie de CCR.
Fan ⁽⁴⁹⁾	2014	Actividad telomerasa presente solo en muestras renales tumorales. Relaciona la presencia de hTERT mRNA con CCR metastásicos.
Hosen ⁽⁶¹⁾	2015	Determina actividad telomerasa en CCR. Estable relación entre hTERT y presencia de actividad telomerasa en CCR.
Pal ⁽⁷⁴⁾	2017	Sobreactivación hTERT mRNA en el desarrollo de CCR y relación de hTERT mRNA con agresividad tumoral.

5.1.2b. Técnicas para el estudio de los ácidos nucleicos en plasma en el CCR.

En la determinación de ácidos nucleicos en plasma es fundamental controlar determinados factores analíticos, tales como la fuente de detección, la hemólisis, el tiempo de procesamiento de las muestras, los anticoagulantes, la temperatura ambiental y de conservación y, principalmente, los protocolos de centrifugación y filtración,⁽⁷⁵⁾ que presentan un gran impacto tanto en las concentraciones finales de los ácidos nucleicos como en la calidad del mismo.⁽⁷⁶⁾

Respecto al beneficio del empleo de plasma *vs* suero se han publicado diversas posturas.^(77, 78) Algunas de ellas hacen referencia a la mayor concentración de ADN en suero que en plasma, justificada por varios autores por la liberación celular secundaria a la lisis de la serie blanca hematológica.⁽⁷⁹⁾ Igualmente, Chiu *et al*,⁽⁸⁰⁾ defienden que el plasma obtenido mediante una única determinación contiene abundantes componentes celulares que implican concentraciones de ADN muy elevadas, recomendando una segunda centrifugación posterior para depurar estos componentes. En nuestro estudio hemos empleado plasma, en base a nuestra experiencia previa con su utilización⁽⁸¹⁾ y bajo las premisas de que el plasma es más estable y que, en este medio, los ácidos nucleicos son realmente libres.⁽⁷⁷⁾ Del mismo modo, realizamos 2 centrifugaciones por los motivos expuestos con anterioridad.

Si bien el ARNm es detectable tanto en plasma como en suero, su estabilidad no está suficientemente estudiada en este medio. La literatura lo considera más frágil que el ADN, en gran parte por la presencia de ribosomas en sangre.⁽⁸²⁾ Las ARNasas presentes en suero serían, en condiciones experimentales de laboratorio, las responsables de la labilidad del ARN libre, aunque determinados autores defienden una estabilidad más real en condiciones fisiológicas.⁽⁸³⁾ Estos factores, junto con la supuesta inestabilidad del ARN en plasma, han llevado a que el empleo de las moléculas de ADN en la mayoría de las publicaciones no sea circunstancial, ya que son varias sus ventajas respecto al ARN, tales como su mayor estabilidad molecular, la mayor facilidad para su aislamiento, detección y amplificación, y el hecho de poder detectar alteraciones moleculares específicas propias del tumor. En nuestro estudio hemos analizado ARNm y ADN, extremando la calidad del procesamiento. Se ha reportado la necesidad de ajustar al máximo los tiempos entre la venopunción de la muestra y la extracción del ARN. En nuestro estudio este tiempo no

fue superior a 2 horas. El aislamiento del plasma se realizó tras dos centrifugaciones, y la conservación hasta la extracción del ARNm y del ADN se realizó a -80°C.

Varios han sido los métodos descritos para el análisis de los ácidos nucleicos circulantes (CNA): radioinmunoensayo,⁽³⁷⁾ PCR competitiva,⁽⁸⁴⁾ PCR cuantitativa en tiempo real⁽⁷⁷⁾ y PCR digital.⁽⁸⁵⁾ El desarrollo de la tecnología de PCR ha permitido simplificar el proceso del análisis de los ácidos nucleicos circulantes, siendo la PCR-RT y, más recientemente la PCR digital, las herramientas más útiles en su procesamiento. En nuestro estudio hemos utilizado PCR-RT tanto en la determinación de ARNm como de ADN. Las tecnologías basadas en PCR pueden amplificar copias de ADN para detectar y cuantificar cantidades extremadamente pequeñas de ácidos nucleicos, en el rango de picogramos o incluso femtogramos, siendo una herramienta útil en oncología.⁽⁸⁶⁾ En nuestro estudio hemos utilizado como medida femtogramos por mililitro (fg/ml).

Empleamos, tras la retrotranscripción del ARN, una técnica de PCR cuantitativa en tiempo real con sondas Taqman. El desarrollo de esta tecnología ha hecho posible una cuantificación fiable, monitorizando toda la reacción PCR mediante la detección de fluorescencia, al permitir la medida del comienzo de la fase exponencial de amplificación, que, como ya se ha comentado con anterioridad, se define como *Crossing Point*.⁽⁸⁷⁾

5.1.3. Limitaciones del estudio

El estudio ha recogido múltiples variables que han generado una gran cantidad de información. Han sido muchos los pacientes y las muestras obtenidas, y precisamente derivado de la cantidad de pacientes incluidos en el mismo, hemos encontrado algunas limitaciones. Entre ellas destaca el problema del seguimiento analítico (que no clínico), para la obtención de la muestra al año de la nefrectomía, ya que en muchos casos no hemos obtenido la respuesta esperada al solicitar el permiso para obtener la muestra, a pesar de que esos mismos pacientes sí habían accedido, mediante la firma del consentimiento informado, a las tomas de muestras perioperatorias. Estas negativas a las extracciones durante el seguimiento han supuesto una reducción en el número de muestras esperadas en esta fase del estudio y en la valoración global de este resultado.

Respecto al procesamiento de las muestras de plasma en el laboratorio no han surgido especiales problemas, al igual que con el procesado de las muestras de tejido. En

ambos casos ha existido una homogeneidad en la obtención de los resultados, al ser realizado este trabajo por una única persona, eliminando así la posibilidad de variabilidad en el procesado de las muestras o la introducción de modificaciones menores en la técnica, que pudieran afectar a los resultados. Este hecho implica una fortaleza añadida a nuestro estudio.

Por otro lado, el hecho de que nuestros resultados analíticos presenten una amplia variabilidad, haciendo que no siguieran una distribución normal en la mayoría de variables analizadas, ha supuesto una limitación a la significación estadística de algunos de nuestros resultados, al tener que utilizar pruebas no paramétricas y utilizar comparación de medianas en la mayoría de los casos para analizar sus inferencias o asociaciones, las cuales son más exigentes, a la hora de verificar significaciones estadísticas. Sin embargo, el hecho de haberse observado en la mayoría de determinaciones una correlación entre los diversos valores de ácidos nucleicos analizados en los distintos momentos del estudio, diferentes en la mayoría de casos a los que presentaban los miembros del grupo control, contribuye a refrendar las diferencias que se han encontrado en los diversos marcadores analizados entre los sujetos sanos y pacientes con CCR.

5.2.- VALOR DEL ANÁLISIS DE ARNm EN MUESTRA DE TEJIDOS CON CCR Y EN TEJIDOS SANOS ADYACENTES AL TUMOR.

Se ha publicado que la telomerasa se activa en el 80-90% de los carcinomas humanos, pero no en las células somáticas normales, por lo que su detección puede ser prometedora como marcador de diagnóstico y/o pronóstico en cáncer.^(54, 74) En lo que se refiere al cáncer renal, Rohde *et al*⁽⁷³⁾ evaluaron la expresión de hTERT ARNm en 35 casos de CCR, encontrando un resultado positivo en 75% de las muestras. También incluyeron 2 angiomiolipomas y un tumor de vías, que fueron negativos para actividad telomerasa, por lo que plantean la relación de la telomerasa con el CCR. Por su parte, Pal *et al*.⁽⁷⁴⁾ encontraron, tras analizar 96 casos de CCR, que hTERT ARNm estaba significativamente sobre-expresado en tejidos de CCR, mientras que no se detectó en muestras de tejido sano.

En nuestra serie, hemos observado que el 68% de los tejidos tumorales fueron positivos para hTERT ARNm, pero también en un 33% de las muestras de tejido renal sano adyacente al tumor. Este resultado es coherente con el de un estudio previo en el que se detectó la expresión de hTERT ARNm en tejido tumoral y también en tejido renal sano.⁽⁸⁸⁾ La presencia de hTERT ARNm en tejido sano se ha interpretado como un efecto derivado de la reacción inflamatoria asociada al proceso tumoral, mediada principalmente por células linfoides.⁽⁵⁴⁾

Por otra parte, el 79% de los CCRcc de nuestro estudio expresaron hTERT ARNm, porcentaje que está muy por encima del resto de tipos histológicos, lo que apunta a que hTERT ARNm podría servir como marcador de diagnóstico histológico para el CCR. Además, en nuestra serie solo 1 de 8 oncocitomas (12.5%) expresó hTERT ARNm, siendo este caso de histología mixta (con un componente asociado de diferenciación sarcomatoide), lo que nos lleva a pensar que esto pudo influir en la positividad a hTERT ARNm de esta muestra de oncocitoma. La expresión de hTERT ARNm en CCR ha sido comunicada en la literatura,^(74, 89) pero no hemos encontrado referencias que relacionen esa expresión con los diferentes subtipos histológicos del CCR, tal y como hemos analizado en nuestra serie.

Otro aspecto a destacar en este estudio fue que en el 80% de los pacientes con afectación ganglionar (N1) se detectó expresión de hTERT ARNm, frente a un 60% de los N0, así como que el Cp en los N1 fue significativamente menor que en los casos N0, implicando que la carga de hTERT ARNm en pacientes con afectación ganglionar fue mayor y, por ende, se detectaría antes en el análisis, otorgando este dato, un valor pronóstico potencial a la determinación tisular de hTERT ARNm en muestras de CCR.

García Olmo *et al*⁽⁶⁵⁾ detectaron, en pacientes con cáncer laríngeo, la expresión de hTERT ARNm en el 72% de las muestras, destacando una mayor frecuencia en pacientes con metástasis. En nuestro caso, el 92% de los pacientes metastásicos al diagnóstico expresaron hTERT ARNm en tejido tumoral frente a un 70% en pM0, y en cantidad significativamente mayor. Esto apoya lo expuesto en el estudio de Pal *et al*,⁽⁷⁴⁾ respecto a la relación de hTERT ARNm con la agresividad tumoral en CCR. Hallazgos similares fueron comunicados por Zhou *et al*.⁽⁹⁰⁾ en el cáncer hepatocelular, quien describe el aumento de la expresión de hTERT ARNm asociado a la invasión y la presencia de metástasis al diagnóstico. Por tanto, los datos obtenidos apoyan el hecho de que la expresión de hTERT ARNm en muestra de tejido tumoral se relaciona con la afectación a distancia del CCR, lo que refrenda el valor pronóstico de este biomarcador, y que la obtención de valores más elevados, deberían alertar de un mayor riesgo de diseminación a distancia.

En relación al estadio TNM, no se encontraron diferencias significativas en la expresión de hTERT ARNm en tejido tumoral entre los diferentes estadios clínicos, aunque sí se observó que la cantidad estimada de hTERT ARNm fue significativamente mayor en estadio IV respecto al resto, al presentar un Cp significativamente inferior. Este dato, junto a los obtenidos en nuestra serie sobre afectación ganglionar y de metástasis a distancia, lleva a considerar su potencial valor pronóstico, en consonancia con resultados de estudios previos,⁽⁵⁵⁾ donde ya se describe una expresión mayor en estadios TNM más avanzados, aunque sin evidenciar significación estadística. Finalmente, estudios en cáncer gástrico⁽⁹¹⁾ también han detectado la relación de la expresión de hTERT ARNm con estadios clínicos avanzados e invasión linfática.

Recientes estudios en los que se analiza la expresión de hTERT mediante técnicas de inmunohistoquímica, son coherentes con los datos obtenidos en nuestro estudio, al poner de evidencia una asociación con la estirpe de CCRcc, y que una mayor expresión

de la proteína hTERT, se asociaba con un comportamiento tumoral más agresivo y con enfermedad avanzada.⁽⁹²⁾

Respecto a la expresión de GAPDH ARNm tanto en tejido tumoral como en tejido sano adyacente al tumor, se evidenció su presencia en todas las muestras de nuestro estudio, si bien el Cp en los casos de CCR fue significativamente menor al de las muestras adyacentes al tumor. Este dato es destacable, ya que al ser GAPDH un gen constitutivo y estable, no debería modificarse su expresión en las diferentes situaciones clínicas en las que se determine. Algunos autores⁽⁹³⁾ han encontrado diferentes niveles de expresión de GAPDH en muestras de CCRcc comparado con su expresión en muestras de tejido sano adyacente al tumor, justificando este hecho en base a la conclusión de que cada tumor es único y puede presentar inestabilidad genómica, que sería la responsable de la alteración en la expresión de los genes constitutivos. En nuestro caso, compartimos esta idea al tiempo que consideramos que la mayor celularidad asociada al tejido tumoral también sería un factor a valorar como elemento discordante en la expresión de GAPDH en muestras tumorales respecto a tejidos sanos.

En definitiva, la expresión de hTERT ARNm es un fenómeno constatable en el CCR. Su mayor expresión en determinados subtipos histológicos, como la diferenciación sarcomatoide y de célula clara, junto a mayores niveles de expresión en casos más avanzados de CCR, hace que su determinación en tejido tumoral de CCR se plantee como marcador de diagnóstico histológico y con valor pronóstico en esta patología.

5.3.- ESTUDIO DE LA UTILIDAD CLÍNICA DE LA DETECCIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE ADN Y ARNm EN PLASMA DE PACIENTES CON CÁNCER DE CÉLULAS RENALES

5.3.1. Valor del ADN en plasma de pacientes con carcinoma de células renales.

5.3.1a. Valor de la detección de hTERT ADN en plasma de pacientes con carcinoma de células renales:

Se ha defendido, en la literatura, que la determinación de la subunidad hTERT en plasma podría interpretarse como indicador de ADN tumoral circulante.⁽⁹⁴⁾ Es por ello que su determinación presente importantes implicaciones diagnósticas y pronósticas en diversas patologías oncológicas, incluido el CCR. En nuestro caso, es destacable que en ninguno de los controles analizados se detectó hTERT ADN en plasma. Del mismo modo, en los pacientes que no expresaron este marcador previo a la nefrectomía, no se objetivó progresión clínica, presentando mejor supervivencia. Por el contrario, aquellos casos en los que hTERT ADN sí estaba presente durante el preoperatorio, se objetivó una mayor incidencia de grados de diferenciación nuclear de Furhman elevados y progresión clínica, siendo, por tanto, pacientes de peor pronóstico.

En la evolución de los niveles de hTERT ADN en los diferentes momentos del estudio, se comprobó que, partiendo de unos niveles preoperatorios medios de 1,7 fg/ml, se produjo un ligero descenso en el postoperatorio inmediato y, posteriormente, un ascenso en el análisis anual (2.2 fg/ml). Interpretamos el descenso tras la intervención como la respuesta en plasma a la eliminación de la fuente emisora de hTERT ADN, en este caso, el tumor renal. Respecto al ascenso de los niveles en el análisis del seguimiento, únicamente se relacionó con el grado de Furhman. Posiblemente un seguimiento a largo plazo pudiera asociar esta detección con datos de progresión.

En la literatura encontramos algunas referencias al análisis de hTERT ADN en plasma que, si bien analizan su relación con los factores clínico-patológicos, no estudian la evolución de los niveles de hTERT ADN plasmáticos en diferentes momentos, como hemos realizado en nuestro estudio. Un estudio donde se analizó la existencia hTERT ADN en plasma de 60 pacientes con cáncer hepático,⁽⁹⁵⁾ comparándolo con sus niveles

en 21 pacientes con virus de la hepatitis B (VHB) en los que se excluyó patología oncológica y con los de 29 controles sanos, demostró la presencia de niveles significativamente más elevados en los tumores hepáticos que en los grupos control y pacientes VHB, asociándose, los niveles de hTERT ADN plasmático, con el tamaño tumoral, el estadio TNM y factores de riesgo como el embolismo venoso. Este estudio asume que los tumores mayores o con mayor potencial invasivo liberarían mayor cantidad de ADN al plasma, suponiendo una evidencia indirecta de que el ADN circulante en plasma procede del tumor⁽⁹⁵⁾. Igualmente, estos niveles se asociaron con factores de peor pronóstico, como la invasión de la vena porta, dato que los autores emplean para sugerir el posible papel de este marcador como herramienta de monitorización de la progresión de enfermedad⁽⁹⁵⁾. En esta línea, en nuestro estudio hemos constatado la presencia de niveles de hTERT ADN en el plasma de pacientes con CCR, frente a su ausencia en controles sanos. Asimismo, la presencia de hTERT ADN preoperatoria se correlacionó con progresión clínica y exitus, al igual que con grados de Furhman 3 y 4, otorgando estos resultados un papel pronóstico importante a la determinación preoperatoria en plasma de esta molécula.

Otros datos que también apoyan el papel pronóstico de este biomarcador y su utilidad en el seguimiento clínico son los obtenidos de la monitorización de los niveles de hTERT ADN durante el postoperatorio, que evidenció un descenso respecto a sus valores prequirúrgicos, si bien persistieron detectables de forma significativa hasta en el 75% de los casos con afectación ganglionar y se correlacionaron igualmente con la presencia de enfermedad metastásica al diagnóstico. En este sentido, diversas publicaciones destacan el papel de la presencia de ácidos nucleicos circulantes en los estadios iniciales de la enfermedad tumoral en relación a su potencial uso en el *screening* y monitorización de la enfermedad.⁽⁹⁶⁾ Altamari *et al*⁽⁹⁷⁾ analizaron el papel de hTERT ADN en plasma en pacientes con cáncer de próstata localizado, concluyendo que esta determinación es un buen candidato para el diagnóstico temprano y la monitorización en este grupo de pacientes.

Respecto a la cuantificación de hTERT ADN plasmático durante el seguimiento destacó la elevación significativa de sus niveles respecto a las muestras pre- y postoperatorias, así como la asociación de niveles persistentemente elevados con grados de diferenciación nuclear de Furman 3 y 4.

5.3.1.b. Valor de la detección de GAPDH ADN en plasma de pacientes con carcinoma de células renales:

La gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH) es uno de los diez enzimas que participan en la glicolisis, y es clave en este proceso celular.⁽⁹⁸⁾ La GAPDH está codificada por un único gen situado en el cromosoma humano XII.⁽⁹⁹⁾

En nuestro estudio hemos cuantificado GAPDH ADN en plasma de 61 pacientes con CCR y en 22 controles sanos, siendo esta determinación significativamente más elevada en pacientes que en controles. Igualmente, se observó que los niveles preoperatorios de GAPDH ADN se asociaron significativamente con algunas de las variables clínico-patológicas analizadas, evidenciándose niveles más elevados en aquellos casos con estadios más avanzados (T3/T4, M1, N1) así como en pacientes que presentaron progresión clínica. La literatura describe resultados similares, así, en los últimos años, Wan *et al*⁽¹⁰⁰⁾ midieron los niveles de cfADN en 92 pacientes con CCRcc durante diferentes fases de la enfermedad, encontrando niveles de cfADN significativamente mayores en pacientes metastásicos frente a pacientes con enfermedad localizada, y demostrando también que los pacientes que recurrían presentaban mayores niveles de cfADN. Así, sugirieron que la determinación sistemática de cfADN en CCR podría servir para monitorizar la recurrencia de la enfermedad⁽¹⁰⁰⁾. Otro análisis interesante sobre el papel diagnóstico y pronóstico de cfADN en el CCRcc, es el realizado recientemente por Yamamoto *et al*.⁽¹⁰¹⁾ Compararon 92 casos de CCRcc con 41 controles sanos, determinando en todos ellos los niveles plasmáticos de cfDNA mediante PCR-RT y midiendo la fragmentación del cfADN en plasma como factores pronósticos en CCR. Este estudio concluye que los niveles de cfADN en CCRcc son más elevados que en controles sanos y que esta elevación está en consonancia con el estadio tumoral (hallando elevaciones superiores a los controles incluso en pacientes con tumores muy localizados y de pequeño tamaño: T1a, N0, M0). Del mismo modo, estos niveles elevados de cfADN se asociaron también con grados de Fuhrman más altos y con la invasión linfovascular.

En nuestro estudio, tras la nefrectomía se observó cómo los niveles de GAPDH ADN aumentaron significativamente respecto a los niveles preoperatorios, estableciéndose también correlación con las variables clínico-patológicas de peor pronóstico, tales como estadios TNM III-IV, estadios T3 y T4, afectación metastásica y progresión clínica. El aumento de los niveles en el postoperatorio inmediato puede

interpretarse como la respuesta en plasma a la agresión quirúrgica y a la manipulación tumoral durante la misma, ya que al año de la intervención los niveles de GAPDH ADN en plasma se normalizaron hasta cifras muy similares a las encontradas en los controles. Por otro lado, en este análisis al año se evidenció un aumento significativo de GAPDH ADN en pacientes con la variedad histológica CCR de células claras, al igual que en pacientes con progresión clínica y en aquellos que desarrollaron metástasis.

Por tanto, de todos estos resultados podemos concluir que la determinación de GAPDH ADN en plasma de pacientes con CCR aporta un importante valor pronóstico y puede ser de utilidad para estratificar el seguimiento de los pacientes. Este aspecto se refrenda en el caso de la cuantificación de GAPDH al año de la nefrectomía, mediante el análisis de la curva ROC, la cual mostró significativamente que los valores de este marcador en un paciente que había progresado durante este tiempo tenían una probabilidad del 92% de ser más alto que el que presentaban los pacientes que permanecían estables. Sin embargo, para el punto de corte óptimo estimado según la prevalencia de progresión en nuestro estudio, la sensibilidad fue baja, pero la especificidad de GAPDH ADN fue muy alta (94%).

5.3.2. Valor de la cuantificación de otras secuencias de ADN total en muestra de plasma de pacientes con carcinoma de células renales.

Planteamos también la determinación “alternativa” de ADN empleando un *kit* comercial estándar, que determina varias secuencias de ADN circulante. Se comprobó cómo los niveles de ADN total medidos por esta técnica se correlacionaron significativamente con los de GAPDH ADN, por lo que pudimos establecer comparaciones fiables entre ambos métodos. De igual forma, los niveles de ADN total también fueron significativamente más altos que los que presentaban los pacientes del grupo control.

Los resultados obtenidos en la determinación de ADN total en plasma mediante esta técnica fueron significativamente elevados en estadios avanzados y pacientes que posteriormente progresaron. Durante el postoperatorio, también se evidenció un aumento de los niveles de ADN total en los pacientes con datos de peor pronóstico, tales como estadios TNM III y IV, estadios T3 y T4 y progresión de enfermedad. Igualmente a lo

que ocurrió con GAPDH ADN, los niveles de ADN total en las muestras de seguimiento descendieron hasta niveles próximos a los determinados en los controles.

Estos resultados nos permiten recomendar el uso de esta técnica sencilla, ya que los resultados obtenidos corroboran los hallazgos de una técnica plenamente establecida como es la determinación de GAPDH ADN. La literatura no refleja experiencias con el empleo del *kit*, que utilizamos en este estudio, en estudios en CCR. Respecto a la técnica de laboratorio, en ambos casos son técnicas simples de reproducir, con tiempos de procesamiento muy similares. En lo referente al coste económico de la determinación de GAPDH ADN *vs* el empleo del *kit* comercial, igualmente ambas son equiparables. Únicamente hemos observado como desventaja en el empleo del *kit* comercial, a nivel de nuestro protocolo de laboratorio, ya que el termociclador que hemos utilizado, emplea capilares, lo cual implica una manipulación adicional de la mezcla, con un posible riesgo de contaminación. Dado que este *kit* se suministra en tubos de 0,2ml listos para aportar únicamente la muestra a analizar e iniciar el protocolo de PCR-RT, en nuestro estudio el traspaso de la mezcla del tubo suministrado al capilar que emplea el termociclador disponible supone un tiempo extra y un riesgo de contaminación, si bien en nuestro caso no hemos observado problemas en este sentido. En caso de disponer de un termociclador que empleara tubos de 0.2 ml, el uso del *kit* sería más ventajoso, al ser el procedimiento más rápido y reducir la manipulación de la muestra. Dado que ambas técnicas se han mostrado equivalentes, el criterio para elegir una u otra técnica estaría en función de los medios de los que se disponga, así como de la experiencia en la determinación de GAPDH y la disponibilidad de los recursos de laboratorio.

5.3.3. Valor del ARNm en plasma de pacientes con carcinoma de células renales.

La utilidad del ARNm plasmático como biomarcador no ha sido tan estudiado en la literatura como en el caso del ADN.⁽⁸²⁾ Esto se debe, como ya se comentó, a la supuesta mayor inestabilidad del ARNm, derivado del papel de las ARNasas, entre otros factores.⁽⁸³⁾ Si bien es cierto que esta inestabilidad es mayor en suero, que es el medio donde mayoritariamente se ha valorado este ácido nucleico, no es tan evidente con el empleo de plasma.⁽⁸³⁾ En nuestro estudio se realizó el análisis de ARNm en plasma de pacientes con CCR, determinando hTERT ARNm y GAPDH ARNm.

5.3.3a. Valor de la detección de GAPDH ARNm en plasma de pacientes con carcinoma de células renales.

La literatura ha descrito niveles elevados de GAPDH ARNm en muestras de plasma de pacientes con cáncer hepático.⁽⁴⁶⁾

Al analizar nuestros resultados sobre la determinación de GAPDH ARNm en plasma, observamos que los niveles medios preoperatorios en pacientes con CCR fueron significativamente más elevados que en los controles (aunque no ocurrió así con sus medianas), lo cual nos sitúa ante un escenario tumoral en el que la GAPDH ARNm está aumentada. Igualmente, se observó una débil correlación entre GAPDH ARNm preoperatorio y el diámetro tumoral, sin encontrar ninguna otra correlación con el resto de variables clínico-patológicas analizadas.

En el postoperatorio inmediato los niveles de GAPDH ARNm plasmático descendieron, sin que se estableciera correlación entre éstos y las variables clínico-patológicas estudiadas. Al año de la intervención, se evidenció un descenso hasta niveles inferiores incluso a los determinados inicialmente en los controles.

Estos resultados hacen pensar que el proceso neoplásico determina la presencia de niveles de GAPDH ARNm elevados en plasma, ya que en los controles estas cifras son inferiores. El hecho de que GAPDH ARNm vaya descendiendo tras la nefrectomía, puede suponer el control de la enfermedad ya que no se evidencian cifras elevadas en plasma en las muestras de seguimiento.

Feng *et al*⁽¹⁰²⁾ determinaron los niveles de ARNm circulante en el suero de 71 pacientes con CCR y los compararon con los niveles obtenidos en 12 pacientes con diagnóstico de oncocitoma y 44 controles sanos, encontrando niveles significativamente más elevados en el suero de pacientes con CCR que en el de los controles y que en aquellos que presentaron histología de oncocitomas. Igualmente lo determinaron en 9 muestras de suero de pacientes con tumor renal a la semana de la nefrectomía, encontrando un descenso de los niveles de ARNm. En nuestro caso, a grandes rasgos nuestros resultados siguen la tendencia descrita en este estudio,⁽¹⁰²⁾ y nuestro análisis, con un mayor número de muestras postoperatorias y una determinación anual, demostró una normalización de los niveles de GAPDH ARNm al año de la nefrectomía, descendiendo

incluso por debajo de los detectados en los controles. No se ha encontrado referencias en la literatura acerca de este aspecto.

En resumen, la determinación de GAPDH ARNm en plasma en nuestro caso ha mostrado una gran variabilidad, ya que ni siquiera encontramos valores aumentados al año en pacientes con enfermedad en progresión. En el caso de GAPDH ARNm determinado en muestra postoperatoria sí que se encontró en las curvas ROC un valor diagnóstico significativo, de manera que un paciente que había progresado tenía una posibilidad del 91% de presentar elevado este marcador durante el postoperatorio en comparación con los que permanecían estables. Sin embargo, para el punto de corte establecido, al igual que ocurrió anteriormente con GAPDH ADN, los valores de sensibilidad fueron bajos pero los de especificidad fueron muy elevados (91%).

5.3.3b. Valor de la detección de hTERT ARNm en plasma de pacientes con carcinoma de células renales.

La actividad telomerasa es el marcador molecular más utilizado para identificar la enfermedad tumoral en fases precoces, siendo la detección de hTERT ARNm en plasma interpretada como ARNm procedente de células tumorales.⁽¹⁰³⁾⁻⁽¹⁰⁴⁾

Analizamos hTERT ARNm en muestra de plasma inicialmente en 21 pacientes, encontrando únicamente un caso positivo (5%). Dado que en casi todos los casos su detección fue negativa, se decidió no proseguir con su análisis, en base a criterios de eficiencia. El caso que dio positividad a este parámetro se trataba de un varón de 48 años, con un CCRcc metastásico T3aN0M1, estadio TNM IV y que falleció a los pocos meses de la nefrectomía. Entre los 21 casos en los que analizamos este parámetro, había igualmente otros pacientes de mal pronóstico y con estadios avanzados, sin que este hecho se asociara con la detección plasmática de hTERT ARNm, por lo que pensamos que su detección no parece aportar información diagnóstica. Sin embargo, es de destacar que las muestras de tejidos procedentes de los tumores de estos mismos pacientes, mayoritariamente sí presentaron niveles elevados de hTERT ARNm. Este hecho puede justificarse por la inestabilidad del ARNm en plasma, así como por su acelerado metabolismo.

La literatura no aporta referencias acerca de la determinación de hTERT ARNm en plasma de pacientes con CCR. En el estudio de la liberación de ARNm al plasma, Okada *et al*⁽¹⁰⁵⁾ defienden que está condicionada por varios factores, como la tasa de crecimiento celular, la densidad celular, la actividad de las ARNasas y la destrucción celular. Desde nuestro punto de vista pensamos que pueden existir diferentes causas por las cuales no alcanzamos a determinar este parámetro, entre ellas destacamos:

- La propia heterogeneidad molecular asociada al CCR.
- La posibilidad de que este parámetro se pudiera encontrar en otro “*momento molecular diferente*”, como pudiera ser a nivel proteico, exosoma, microARN, etc., y que no se ha determinado en este estudio.
- Otra justificación derivaría de la propia expresión de hTERT ARNm, entendiendo ésta como un fenómeno muy precoz en la carcinogénesis renal, con un rápido metabolismo a nivel plasmático. En este sentido, si bien nuestra serie está formada mayoritariamente por pacientes con CCR de diagnóstico incidental y con tumores localizados, es posible que la ausencia de detección de hTERT ARNm en nuestro análisis obedezca al momento en que se toma la muestra, que sería un momento “*clínicamente*” precoz pero quizás “*molecularmente*” tardío, derivado del rápido metabolismo del ARNm en plasma o de su posible expresión precoz durante la carcinogénesis.

Descartamos una inadecuación de la técnica de PCR, dado que García-Olmo *et al*⁽⁶⁵⁾ sí encontraron expresión en plasma de hTERT ARNm en cáncer laríngeo con la misma técnica que hemos empleado, lo que implica que sea poco probable un problema de técnica de laboratorio como causa de la no detección de hTERT ARNm en plasma en nuestro caso.

Varios autores han comunicado la detección de hTERT ARNm en plasma en diferentes tipos de tumores: colorrectal,^(106, 107) pulmón,⁽¹⁰⁸⁾ hepático,⁽¹⁰⁹⁾ mama,⁽¹¹⁰⁾ próstata.⁽¹¹¹⁾ Recientemente, March-Villalba *et al*⁽¹¹²⁾ han comunicado el papel de hTERT ARNm en plasma como marcador útil en el diagnóstico de cáncer de próstata, con una técnica de laboratorio muy similar a la empleada en nuestro estudio. Estos datos junto a la amplia variedad de tumores en los cuales sí se ha detectado hTERT ARNm en plasma y la ausencia de publicaciones en CCR sobre este aspecto, refrenda, en nuestra opinión,

la teoría de la heterogeneidad molecular del CCR como causa más probable de la no detección en nuestro estudio de hTERT ARNm en plasma.

5.4. COMENTARIO FINAL.

La búsqueda de biomarcadores validados que ayuden al diagnóstico precoz y a la monitorización del curso de la enfermedad en una enfermedad tan prevalente y agresiva como es el cáncer renal es un reto importante.

En este sentido, el valor clínico del análisis del ADN y el ARNm, tanto de hTERT como de GAPDH, es real, ya que, como hemos visto, en la mayoría de casos tienen valor pronóstico en el seguimiento y relación con las variables clínico-patológicas de peor pronóstico. Por otro lado, es de destacar el papel como marcador de diagnóstico histológico y pronóstico que la determinación de hTERT ARNm tiene en el análisis de la muestra de tejido de CCR, ya que es posible predecir la evolución clínica de cada paciente, implementando un estrecho seguimiento de cara a detectar la progresión de enfermedad en sus fases más incipientes.

En nuestra opinión, evaluar los hallazgos de la determinación de ácidos nucleicos en muestras de tumor de CCR y compararlos con el análisis de éstos a nivel del plasma del mismo paciente es un proceso muy interesante, ya que ha permitido poner de evidencia cómo el proceso tumoral no se circunscribe al órgano, sino que tiene una importante repercusión a nivel sistémico, observando las variaciones en plasma de los distintos marcadores tras la nefrectomía y como, en algunos casos de peor pronóstico (T3-T4, estadios III-IV, M1 y desarrollo de progresión clínica), sus niveles persisten elevados varios meses después de la cirugía, relacionándose con el desarrollo de metástasis y la afectación ganglionar, o lo que es lo mismo, con la extensión de enfermedad.

Al analizar los diferentes marcadores en plasma destaca la estrecha relación de éstos con la progresión clínica, siendo de interés relevante que se asocien de manera constante con la progresión de la enfermedad en el seguimiento, refrendando de este modo los aspectos comentados previamente sobre el papel pronóstico de estos biomarcadores.

La facilidad para obtener muestras de sangre periférica, mediante una técnica sencilla, fiable y reproducible, así como el desarrollo y la accesibilidad actual a las tecnologías basadas en PCR, permite plantear que estos biomarcadores puedan analizarse

sobre grupos de pacientes más amplios, de cara a encontrar el camino que permita trasladar a la práctica clínica diaria el beneficio que estos biomarcadores pueden aportar.

Creemos que los resultados de este estudio aconsejan un desarrollo a más largo plazo, derivado de la caprichosa evolución del CCR y de su potencial de progresión clínica. Si bien el seguimiento máximo ha sido de 3 años en los primeros pacientes incluidos en el estudio, pensamos que un seguimiento de la cohorte a 5 y 10 años podrá aportar datos muy interesantes y útiles para el manejo clínico de estos pacientes.

6. CONCLUSIONES

1. En las muestras de tumor de pacientes con carcinoma de células renales, fue frecuente, aunque no generalizada, la expresión de ARNm del gen *hTERT*. La detección de esta molécula por técnicas de PCR se asoció a determinados subtipos histológicos (célula clara y con diferenciación sarcomatoide) y a estadios avanzados, lo cual, potencialmente, le confiere valor diagnóstico y pronóstico.
2. A pesar del alto porcentaje de tumores en los que se encontró ARNm de *hTERT*, la detección de estas secuencias en plasma de los mismos pacientes fue prácticamente inexistente.
3. Los pacientes con carcinoma de células renales presentaron niveles plasmáticos de ARNm del gen *GAPDH* más elevados que los voluntarios sanos, por lo que esta determinación puede servir como herramienta diagnóstica complementaria. Asimismo, los niveles pre y postoperatorios se asociaron con la progresión clínica, por lo que también pueden constituir un parámetro útil en el pronóstico y el seguimiento clínico.
4. En la mayoría de los pacientes de carcinoma de células renales pudo detectarse en plasma secuencias de ADN del gen *hTERT*, sin embargo, esta detección fue negativa en todos los voluntarios sanos, por lo que puede atribuirse valor diagnóstico a esta determinación. Asimismo, aunque pudo detectarse ADN del gen *GAPDH* en el plasma de todos los sujetos, los niveles fueron muy superiores en los pacientes de cáncer.
5. La detección de altos niveles de ADN plasmático en pacientes con carcinoma renal se asoció con variables clinico-patológicas de mal pronóstico, lo que apoya su uso como biomarcador en el diagnóstico y seguimiento de esta patología.

7. RESUMEN

7.1.- INTRODUCCIÓN

El carcinoma de células renales (CCR) representa el 2% de todos los tumores en el ser humano y es la 3ª neoplasia urológica en frecuencia. Es la lesión sólida más frecuente en el riñón y supone el 90% de todos los tumores renales malignos. Engloba diferentes subtipos, con características histopatológicas y genéticas específicas. Respecto a sus factores de riesgo destacan el tabaquismo, la obesidad y la exposición ocupacional.

El CCR es una entidad clínica que se define por su heterogeneidad, con múltiples formas de presentación a nivel clínico e histológico que lo convierten en una patología compleja. Existe actualmente una tendencia al diagnóstico incidental, facilitado por las mejoras tecnológicas en las pruebas de imagen, así como la accesibilidad relativamente frecuente a las mismas. Actualmente no existe un marcador tumoral ni de diagnóstico precoz definido para esta patología. La posibilidad de contar con un marcador tumoral fiable en cáncer renal sería fundamental para categorizar y tratar adecuadamente una masa renal, permitiendo aumentar los diagnósticos en estadios más tempranos y favoreciendo un tratamiento precoz que implicaría mejoras importantes en el pronóstico de esta enfermedad.

La biopsia clásica de tejido ante la sospecha de lesión tumoral ha sido el *gold estándar* en oncología. En el CCR este procedimiento, si bien es relativamente infrecuente en la práctica diaria, asocia importantes inconvenientes para el paciente, como invasividad y problemas perioperatorios, necesidad de anestesia, etc. En este sentido, el creciente interés de los hallazgos sobre los ácidos nucleicos libres en plasma, ha hecho que la “biopsia líquida” pueda ser una alternativa válida en diferentes líquidos biológicos. Esta técnica posibilita la toma de muestras repetidas, poco invasivas y reproducibles en el tiempo, lo que facilitaría el control en la evolución y progresión de la enfermedad, en contraposición a la imagen estática aportada por una biopsia tradicional. Es por ello, que en el presente trabajo se planteen como objetivos:

7.2.- OBJETIVOS

Objetivo general.

Evaluar la utilidad clínica de la detección y cuantificación de ADN y ARNm en plasma de pacientes con cáncer de células renales.

Objetivos específicos.

- a.- Evaluar la utilidad clínica y pronóstica de la expresión del gen que codifica la telomerasa humana en tejido tumoral y plasma.
- b.- Evaluar la utilidad de la cuantificación de ADN y de ARNm (hTERT y GAPDH) en plasma como herramienta diagnóstica del cáncer de células renales.
- c.- Analizar la correlación entre los niveles de ADN y ARNm plasmáticos y las características clínico-patológicas del tumor.
- d.- Analizar la correlación entre los niveles de ADN y ARNm plasmáticos y la evolución clínica tras el tratamiento y seguimiento a largo plazo.

7.3.- SUJETOS, MATERIALES Y MÉTODOS

Se trata de un estudio de cohortes prospectivo formado por 120 pacientes diagnosticados de CCR y tratados quirúrgicamente en la GAI de Albacete. La muestra final del estudio fue de 111 muestras de tejido tumoral de CCR y 94 muestras de tejido pareado sano. Para el análisis de los plasmas se utilizó un grupo control, tras comprobar la ausencia de cualquier antecedente de enfermedad oncológica. Para la detección y cuantificación plasmática de ARNm se emplearon muestras de 77 pacientes y 31 controles, mientras que el análisis de ADN se utilizaron 61 muestras y 22 controles.

De cada uno de los pacientes incluidos se extrajeron muestras de sangre periférica en el preoperatorio, postoperatorio inmediato (3-5 días), y un año después de la intervención, junto con el análisis paralelo de muestras de tejido tumoral y tejido renal sano adyacente de su pieza quirúrgica. Las muestras de nefrectomías fueron sometidas al estudio anatomopatológico protocolizado. Además, mediante el Biobanco de tumores de nuestro centro, se realizó la extracción de ARNm tanto de las muestras tumorales como de las de tejido sano adyacente al tumor, utilizando para ello *kits* comerciales. Posteriormente se aplicó una técnica de PCR-RT para detectar el ARNm específico (tanto para hTERT como para GAPDH). El análisis de plasma implicó la extracción y cuantificación de ADN y ARNm mediante PCR-RT, igualmente dirigido a la determinación de los biomarcadores hTERT y GAPDH en cada una de las muestras. En los voluntarios sanos se realizó una única determinación plasmática de cada uno de los parámetros analizados.

Igualmente se analizaron variables socio-demográficas, clínicas, histopatológicas, factores de riesgo conocidos y respuesta a tratamientos complementarios. Se realizó un análisis descriptivo para describir la distribución de cada variable, un análisis de supervivencia y un análisis de rendimiento diagnóstico como método de medida global de la exactitud de la prueba en la predicción de recidiva o exitus por CCR. El estudio fue aprobado por el Comité Ético de Investigación Clínica de nuestro centro, autorizando todos los sujetos incluidos su participación mediante la firma del consentimiento informado.

7.4.- RESULTADOS

7.4.1 Análisis descriptivo de la muestra.

La muestra estuvo compuesta por 120 pacientes (84 varones y 36 mujeres), con una edad media de 60.7 años. Más del 50% de los pacientes presentaron factores de riesgo para CCR. El tamaño medio de la lesión fue de 5.5cm, con predominio histológico de CCRcc y presentaron en 52% de los casos un grado de diferenciación nuclear de Furhman de 2.

7.4.2 Detección de ARNm en muestra de tejido.

Todas las muestras de tejido tumoral y de tejido pareado adyacente al tumor expresaron GAPDH ARNm, siendo el Cp de muestras tumorales significativamente inferior al de las pareadas. Respecto a la expresión de hTERT ARNm, el 68% de las muestras tumorales lo expresaron frente a un 33% de las pareadas sanas. Las diferencias en la expresión de hTERT ARNm según los diferentes subtipos histológicos fueron estadísticamente significativas ($p < 0.0001$), destacando que el Cp de los CCR con diferenciación sarcomatoide fue menor al del resto de subtipos histológicos (media: 29,2; IC95; 22.1 -36.20; $p < 0,001$). Igualmente, el Cp de los tumores metastásicos, con afectación ganglionar y los estadios TNM IV fue significativamente inferior al de lesiones localizadas.

7.4.3 Detección y cuantificación de ARN en plasma.

El análisis de GAPDH ARNm en plasma dio valores significativamente más elevados en muestras preoperatorias de pacientes que en voluntarios sanos. Tras la nefrectomía estos valores disminuyeron progresivamente hasta ser inferiores, al año de la intervención, a los determinados inicialmente en sujetos sanos. Destacó especialmente la

relación que la cuantificación de GAPDH ARNm pre- y postoperatoria en plasma estableció con el estadio M y la progresión clínica. La cuantificación de hTERT ARNm en plasma fue negativa en casi todos los casos.

7.4.4 Detección y cuantificación de ADN en plasma.

La detección de hTERT ADN en plasma no se evidenció en ninguno de los 22 controles analizados, mientras que sí se pudo comprobar en el 54,1% de los pacientes. En el análisis de éstos, destacó la relación de su detección preoperatoria con la progresión de enfermedad y con los grados Furhman 3 y 4. Del mismo modo, los niveles postoperatorios se asociaron con los estadios N y M, mientras que la determinación al año de la nefrectomía se relacionó con los grados Furhman más elevados.

El análisis cuantitativo de GAPDH ADN como marcador en plasma se asoció, tanto pre- como postoperatoriamente, con los estadios T, M y TNM, así como con la progresión clínica. Igualmente, su determinación durante el seguimiento (muestra anual) se asoció con el subtipo histológico de células claras (CCRcc), el estadio M y la progresión clínica.

7.4.5 Rendimiento diagnóstico de la cuantificación de ADN y ARNm en plasma.

El análisis de la exactitud diagnóstica de los marcadores utilizados en la predicción de progresión y mortalidad mostró que el valor de GAPDH ADN plasmático de un paciente que progresa durante el seguimiento, tiene una probabilidad del 92,2% de ser más alto que el de uno que permanece estable ($p = 0,045$) y que el valor de GAPDH ARNm postoperatorio de un paciente que progresa tiene un 91,3% de ser más alto que el de uno que permanece estable ($p = 0,049$).

7.5.- CONCLUSIONES

En las muestras de tumor de pacientes con carcinoma de células renales, fue frecuente, aunque no generalizada, la expresión de ARNm del gen *hTERT*, asociándose a determinados subtipos histológicos (célula clara y con diferenciación sarcomatoide) y a estadios avanzados. Del mismo modo, los pacientes con CCR presentaron niveles plasmáticos de ARNm del gen *GAPDH* más elevados que los voluntarios sanos. Asimismo, los niveles plasmáticos de ARNm del gen *GAPDH* pre y postoperatorios se

relacionaron con progresión clínica. La detección de altos niveles de ADN plasmático en pacientes con carcinoma renal se asoció con variables clinico-patológicas de mal pronóstico. Por todo ello, la determinación en tumor y plasma de estos biomarcadores podría considerarse como una herramienta más en el diagnóstico, pronóstico y seguimiento de pacientes, si bien serían necesarios estudios más amplios y a largo plazo para confirmar estos hallazgos.

8. BIBLIOGRAFÍA

1. Ljungberg B, Bensalah K, Canfield S, Dabestani S, Hofmann F, Hora M, et al. EAU guidelines on renal cell carcinoma: 2014 update. *Eur Urol*. 2015;67(5):913-24.
2. Kovacs G, Akhtar M, Beckwith BJ, Bugert P, Cooper CS, Delahunt B, et al. The Heidelberg classification of renal cell tumours. *J Pathol*. 1997;183(2):131-3.
3. Levi F, Ferlay J, Galeone C, Lucchini F, Negri E, Boyle P, et al. The changing pattern of kidney cancer incidence and mortality in Europe. *BJU Int*. 2008;101(8):949-58.
4. Registries ENOC. Kidney cancer in Europe. <http://www.encr.eu/index.php/publications/factsheets>: Joint Research Centre. European Commission. Italy; 2017.
5. Souza DL, Bernal MM. [Incidence, prevalence and mortality of kidney cancer in Spain: estimates and projections for the 1998-2022 period]. *Actas Urol Esp*. 2012;36(9):521-6.
6. Hunt JD, van der Hel OL, McMillan GP, Boffetta P, Brennan P. Renal cell carcinoma in relation to cigarette smoking: meta-analysis of 24 studies. *Int J Cancer*. 2005;114(1):101-8.
7. Lorente D, Trilla E, Meseguer A, Planas J, Placer J, Celma A, et al. Systematic review of renal carcinoma prognostic factors. *Actas Urol Esp*. 2017;41(4):215-25.
8. Inamura K. Renal Cell Tumors: Understanding Their Molecular Pathological Epidemiology and the 2016 WHO Classification. *Int J Mol Sci*. 2017;18(10).
9. Moch H, Cubilla AL, Humphrey PA, Reuter VE, Ulbright TM. The 2016 WHO Classification of Tumours of the Urinary System and Male Genital Organs-Part A: Renal, Penile, and Testicular Tumours. *Eur Urol*. 2016;70(1):93-105.
10. Algaba F, Arce Y, Trias I, Santaularia JM, Antonio Rosales A. [Usefulness of the present renal cell carcinoma classifications]. *Actas Urol Esp*. 2006;30(4):372-85.
11. Lang H, Lindner V, de Fromont M, Molinié V, Letourneux H, Meyer N, et al. Multicenter determination of optimal interobserver agreement using the Fuhrman grading system for renal cell carcinoma: Assessment of 241 patients with > 15-year follow-up. *Cancer*. 2005;103(3):625-9.
12. Paner GP, Stadler WM, Hansel DE, Montironi R, Lin DW, Amin MB. Updates in the Eighth Edition of the Tumor-Node-Metastasis Staging Classification for Urologic Cancers. *Eur Urol*. 2018;73(4):560-9.
13. Amin MB, Greene FL, et al. *AJCC Cancer Staging Manual*. ed. 8. Switzerland: Springer; 2017.
14. Kim SP, Alt AL, Weight CJ, Costello BA, Cheville JC, Lohse C, et al. Independent validation of the 2010 American Joint Committee on Cancer TNM classification for renal cell carcinoma: results from a large, single institution cohort. *J Urol*. 2011;185(6):2035-9.
15. Ljungberg B, Cowan NC, Hanbury DC, Hora M, Kuczyk MA, Merseburger AS, et al. EAU guidelines on renal cell carcinoma: the 2010 update. *Eur Urol*. 2010;58(3):398-406.
16. Li P, Wong YN, Armstrong K, Haas N, Subedi P, Davis-Cerone M, et al. Survival among patients with advanced renal cell carcinoma in the pretargeted versus targeted therapy eras. *Cancer Med*. 2016;5(2):169-81.
17. Grande Pulido E, Martín Centeno A, Maroto Rey P, Solsona Narbón E. [Molecular biology of the clear cell renal cell carcinoma: principles for a selective treatment]. *Actas Urol Esp*. 2007;31(3):233-43.
18. Murray NP, Fuentealba C, Reyes E, Jacob O. A comparison of 3 on-line nomograms with the detection of primary circulating prostate cells to predict prostate cancer at initial biopsy. *Actas Urol Esp*. 2017;41(4):234-41.
19. Zastrow S, Brookman-May S, Cong TA, Jurk S, von Bar I, Novotny V, et al. Decision curve analysis and external validation of the postoperative Karakiewicz nomogram for renal cell carcinoma based on a large single-center study cohort. *World J Urol*. 2015;33(3):381-8.
20. Heng DY, Xie W, Regan MM, Warren MA, Golshayan AR, Sahi C, et al. Prognostic factors for overall survival in patients with metastatic renal cell carcinoma treated with vascular

- endothelial growth factor-targeted agents: results from a large, multicenter study. *J Clin Oncol.* 2009;27(34):5794-9.
21. Krambeck AE, Gettman MT. [Robotic renal surgery: radical and partial nephrectomy]. *Arch Esp Urol.* 2007;60(4):462-70.
22. Blom JH, van Poppel H, Maréchal JM, Jacqmin D, Schröder FH, de Prijck L, et al. Radical nephrectomy with and without lymph-node dissection: final results of European Organization for Research and Treatment of Cancer (EORTC) randomized phase 3 trial 30881. *Eur Urol.* 2009;55(1):28-34.
23. Peng J, Mo R, Ma J, Fan J. let-7b and let-7c are determinants of intrinsic chemoresistance in renal cell carcinoma. *World J Surg Oncol.* 2015;13:175.
24. Chen J, Zhu H, Zhang Y, Cui MH, Han LY, Jia ZH, et al. Low expression of phosphatase and tensin homolog in clear-cell renal cell carcinoma contributes to chemoresistance through activating the Akt/HDM2 signaling pathway. *Mol Med Rep.* 2015;12(2):2622-8.
25. Hajgude V, Umalkar R. A clinical study of patients with renal cell carcinoma. *International Surgery Journal*; Vol 3, No 1 (2016): January-March 2016 DO - 1018203/2349-2902isj20160250. 2016.
26. Pang S, Sun Y, Wu L, Yang L, Zhao YL, Wang Z, et al. Reconstruction of kidney renal clear cell carcinoma evolution across pathological stages. *Sci Rep.* 2018;8(1):3339.
27. Akcaglar S, Yavascaoglu I, Vuruskan H, Oktay B. Genetic evaluation of von Hippel-Lindau disease for early diagnosis and improved prognosis. *Int Urol Nephrol.* 2008;40(3):615-20.
28. Giménez-Bachs JM, Salinas-Sánchez AS, Serrano-Oviedo L, Nam-Cha SH, Rubio-Del Campo A, Sánchez-Prieto R. Carbonic anhydrase IX as a specific biomarker for clear cell renal cell carcinoma: comparative study of Western blot and immunohistochemistry and implications for diagnosis. *Scand J Urol Nephrol.* 2012;46(5):358-64.
29. Farber NJ, Kim CJ, Modi PK, Hon JD, Sadimin ET, Singer EA. Renal cell carcinoma: the search for a reliable biomarker. *Transl Cancer Res.* 2017;6(3):620-32.
30. Chu D, Park BH. Liquid biopsy: unlocking the potentials of cell-free DNA. *Virchows Arch.* 2017.
31. García-Casas A, García-Olmo DC, García-Olmo D. Further the liquid biopsy: Gathering pieces of the puzzle of genomestasis theory. *World J Clin Oncol.* 2017;8(5):378-88.
32. De Mattos-Arruda L, Caldas C. Cell-free circulating tumour DNA as a liquid biopsy in breast cancer. *Mol Oncol.* 2016;10(3):464-74.
33. González-Masiá JA, García-Olmo D, García-Olmo DC. Circulating nucleic acids in plasma and serum (CNAPS): applications in oncology. *Onco Targets Ther.* 2013;6:819-32.
34. Bhangu JS, Taghizadeh H, Braunschmid T, Bachleitner-Hofmann T, Mannhalter C. Circulating cell-free DNA in plasma of colorectal cancer patients - A potential biomarker for tumor burden. *Surg Oncol.* 2017;26(4):395-401.
35. Ellinger J, Müller DC, Müller SC, Hauser S, Heukamp LC, von Ruecker A, et al. Circulating mitochondrial DNA in serum: a universal diagnostic biomarker for patients with urological malignancies. *Urol Oncol.* 2012;30(4):509-15.
36. Furge KA, Tan MH, Dykema K, Kort E, Stadler W, Yao X, et al. Identification of deregulated oncogenic pathways in renal cell carcinoma: an integrated oncogenomic approach based on gene expression profiling. *Oncogene.* 2007;26(9):1346-50.
37. Leon SA, Shapiro B, Sklaroff DM, Yaros MJ. Free DNA in the serum of cancer patients and the effect of therapy. *Cancer Res.* 1977;37(3):646-50.
38. Cohen SJ, Punt CJ, Iannotti N, Saidman BH, Sabbath KD, Gabrail NY, et al. Relationship of circulating tumor cells to tumor response, progression-free survival, and overall survival in patients with metastatic colorectal cancer. *J Clin Oncol.* 2008;26(19):3213-21.
39. M. H. Ácidos nucleicos tumorales circulantes en plasma como nuevo método no invasivo para detección y monitoreo de cáncer. www.oncosalud.pe/Carcinos.2016. p. 39-45.

40. Theodor L, Melzer E, Sologov M, Idelman G, Friedman E, Bar-Meir S. Detection of pancreatic carcinoma: diagnostic value of K-ras mutations in circulating DNA from serum. *Dig Dis Sci.* 1999;44(10):2014-9.
41. Gold B, Cankovic M, Furtado LV, Meier F, Gocke CD. Do circulating tumor cells, exosomes, and circulating tumor nucleic acids have clinical utility? A report of the association for molecular pathology. *J Mol Diagn.* 2015;17(3):209-24.
42. Marzese DM, Hirose H, Hoon DS. Diagnostic and prognostic value of circulating tumor-related DNA in cancer patients. *Expert Rev Mol Diagn.* 2013;13(8):827-44.
43. Hauser S, Zahalka T, Ellinger J, Fechner G, Heukamp LC, VON Ruecker A, et al. Cell-free circulating DNA: Diagnostic value in patients with renal cell cancer. *Anticancer Res.* 2010;30(7):2785-9.
44. Souza MF, Kuasne H, Barros-Filho MC, Cilião HL, Marchi FA, Fuganti PE, et al. Circulating mRNAs and miRNAs as candidate markers for the diagnosis and prognosis of prostate cancer. *PLoS One.* 2017;12(9):e0184094.
45. Pös O, Biró O, Szemes T, Nagy B. Circulating cell-free nucleic acids: characteristics and applications. *Eur J Hum Genet.* 2018.
46. Ng EK, Tsui NB, Lam NY, Chiu RW, Yu SC, Wong SC, et al. Presence of filterable and nonfilterable mRNA in the plasma of cancer patients and healthy individuals. *Clin Chem.* 2002;48(8):1212-7.
47. Mittra I, Khare NK, Raghuram GV, Chaubal R, Khambatti F, Gupta D, et al. Circulating nucleic acids damage DNA of healthy cells by integrating into their genomes. *J Biosci.* 2015;40(1):91-111.
48. Chen Z, Fadiel A, Naftolin F, Eichenbaum KD, Xia Y. Circulation DNA: biological implications for cancer metastasis and immunology. *Med Hypotheses.* 2005;65(5):956-61.
49. Kuo YB, Chen JS, Fan CW, Li YS, Chan EC. Comparison of KRAS mutation analysis of primary tumors and matched circulating cell-free DNA in plasmas of patients with colorectal cancer. *Clin Chim Acta.* 2014;433:284-9.
50. Hauser S, Zahalka T, Fechner G, Müller SC, Ellinger J. Serum DNA hypermethylation in patients with kidney cancer: results of a prospective study. *Anticancer Res.* 2013;33(10):4651-6.
51. Coco S, Alama A, Vanni I, Fontana V, Genova C, Dal Bello MG, et al. Circulating Cell-Free DNA and Circulating Tumor Cells as Prognostic and Predictive Biomarkers in Advanced Non-Small Cell Lung Cancer Patients Treated with First-Line Chemotherapy. *Int J Mol Sci.* 2017;18(5).
52. Lui YY, Woo KS, Wang AY, Yeung CK, Li PK, Chau E, et al. Origin of plasma cell-free DNA after solid organ transplantation. *Clin Chem.* 2003;49(3):495-6.
53. Bianchi DW. Circulating fetal DNA: its origin and diagnostic potential-a review. *Placenta.* 2004;25 Suppl A:S93-S101.
54. Chen CH, Chen RJ. Prevalence of telomerase activity in human cancer. *J Formos Med Assoc.* 2011;110(5):275-89.
55. Pal D, Sharma U, Khajuria R, Singh SK, Kakkar N, Prasad R. Augmented telomerase activity, reduced telomere length and the presence of alternative lengthening of telomere in renal cell carcinoma: plausible predictive and diagnostic markers. *Gene.* 2015;562(2):145-51.
56. Greider CW, Blackburn EH. Identification of a specific telomere terminal transferase activity in Tetrahymena extracts. *Cell.* 1985;43(2 Pt 1):405-13.
57. CV. La importancia de los telómeros en varias enfermedades 2015.
58. Fang L, Cheng Q, Li W, Liu J, Li L, Xu K, et al. Antitumor activities of an oncolytic adenovirus equipped with a double siRNA targeting Ki67 and hTERT in renal cancer cells. *Virus Res.* 2014;181:61-71.
59. Dunham MA, Neumann AA, Fasching CL, Reddel RR. Telomere maintenance by recombination in human cells. *Nat Genet.* 2000;26(4):447-50.



60. Kyo S, Kanaya T, Takakura M, Tanaka M, Inoue M. Human telomerase reverse transcriptase as a critical determinant of telomerase activity in normal and malignant endometrial tissues. *Int J Cancer*. 1999;80(1):60-3.
61. Hosen I, Rachakonda PS, Heidenreich B, Sitaram RT, Ljungberg B, Roos G, et al. TERT promoter mutations in clear cell renal cell carcinoma. *Int J Cancer*. 2015;136(10):2448-52.
62. Hiyama E, Hiyama K, Yokoyama T, Matsuura Y, Piatyszek MA, Shay JW. Correlating telomerase activity levels with human neuroblastoma outcomes. *Nat Med*. 1995;1(3):249-55.
63. Rambhatla L, Chiu CP, Glickman RD, Rowe-Rendleman C. In vitro differentiation capacity of telomerase immortalized human RPE cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2002;43(5):1622-30.
64. March-Villalba JA, Panach-Navarrete J, Herrero-Cervera MJ, Aliño-Pellicer S, Martínez-Jabaloyas JM. hTERT mRNA expression in urine as a useful diagnostic tool in bladder cancer. Comparison with cytology and NMP22 BladderCheck Test®. *Actas Urol Esp*. 2018.
65. García-Olmo DC, Contreras JD, Picazo MG, López-Torres J, García-Olmo D. Potential clinical significance of perioperative levels of mRNA in plasma from patients with cancer of the larynx or hypopharynx. *Head Neck*. 2017;39(4):647-55.
66. Cheng J, Tang Q, Cao X, Burwinkel B. Cell-Free Circulating DNA Integrity Based on Peripheral Blood as a Biomarker for Diagnosis of Cancer: A Systematic Review. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2017;26(11):1595-602.
67. De Mattos-Arruda L. Liquid biopsy for HER2-positive breast cancer brain metastasis: the role of the cerebrospinal fluid. *ESMO Open*. 2. England2017. p. e000270.
68. de Onis M, Onyango AW, Borghi E, Siyam A, Nishida C, Siekmann J. Development of a WHO growth reference for school-aged children and adolescents. *Bull World Health Organ*. 2007;85(9):660-7.
69. Golombos DM, Chughtai B, Trinh QD, Thomas D, Mao J, Te A, et al. Minimally invasive vs open nephrectomy in the modern era: does approach matter? *World J Urol*. 2017;35(10):1557-68.
70. Liss MA, Wang S, Palazzi K, Jabaji R, Patel N, Lee HJ, et al. Evaluation of national trends in the utilization of partial nephrectomy in relation to the publication of the American Urologic Association guidelines for the management of clinical T1 renal masses. *BMC Urol*. 2014;14:101.
71. Mehle C, Piatyszek MA, Ljungberg B, Shay JW, Roos G. Telomerase activity in human renal cell carcinoma. *Oncogene*. 1996;13(1):161-6.
72. Bryan TM, Englezou A, Dalla-Pozza L, Dunham MA, Reddel RR. Evidence for an alternative mechanism for maintaining telomere length in human tumors and tumor-derived cell lines. *Nat Med*. 1997;3(11):1271-4.
73. Rohde V, Sattler HP, Oehlenschläger B, Forster S, Zwergel T, Seitz G, et al. Genetic changes and telomerase activity in human renal cell carcinoma. *Clin Cancer Res*. 1998;4(1):197-202.
74. Pal D, Sharma U, Singh SK, Kakkar N, Prasad R. Inhibition of hTERT expression by MAP kinase inhibitor induces cell death in renal cell carcinoma. *Urol Oncol*. 2017;35(6):401-8.
75. Wong SC, Ma BB, Lai PB, Ng SS, Lee JF, Hui EP, et al. The effect of centrifugation on circulating mRNA quantitation opens up a new scenario in expression profiling from patients with metastatic colorectal cancer. *Clin Biochem*. 2007;40(16-17):1277-84.
76. Enache LS, Enache EL, Ramière C, Diaz O, Bancu L, Sin A, et al. Circulating RNA molecules as biomarkers in liver disease. *Int J Mol Sci*. 2014;15(10):17644-66.
77. Thijssen MA, Swinkels DW, Ruers TJ, de Kok JB. Difference between free circulating plasma and serum DNA in patients with colorectal liver metastases. *Anticancer Res*. 2002;22(1A):421-5.
78. Jung M, Klotzek S, Lewandowski M, Fleischhacker M, Jung K. Changes in concentration of DNA in serum and plasma during storage of blood samples. *Clin Chem*. 2003;49(6 Pt 1):1028-9.

79. Ellinger J, Wittkamp V, Albers P, Perabo FG, Mueller SC, von Ruecker A, et al. Cell-free circulating DNA: diagnostic value in patients with testicular germ cell cancer. *J Urol*. 2009;181(1):363-71.
80. Chiu RW, Poon LL, Lau TK, Leung TN, Wong EM, Lo YM. Effects of blood-processing protocols on fetal and total DNA quantification in maternal plasma. *Clin Chem*. 2001;47(9):1607-13.
81. García-Olmo DC, Picazo MG, Toboso I, Asensio AI, García-Olmo D. Quantitation of cell-free DNA and RNA in plasma during tumor progression in rats. *Mol Cancer*. 2013;12:8.
82. Reddi KK, Holland JF. Elevated serum ribonuclease in patients with pancreatic cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1976;73(7):2308-10.
83. Tsui NB, Ng EK, Lo YM. Stability of endogenous and added RNA in blood specimens, serum, and plasma. *Clin Chem*. 2002;48(10):1647-53.
84. Jahr S, Hentze H, Englisch S, Hardt D, Fackelmayer FO, Hesch RD, et al. DNA fragments in the blood plasma of cancer patients: quantitations and evidence for their origin from apoptotic and necrotic cells. *Cancer Res*. 2001;61(4):1659-65.
85. Tsao SC, Weiss J, Hudson C, Christophi C, Cebon J, Behren A, et al. Monitoring response to therapy in melanoma by quantifying circulating tumour DNA with droplet digital PCR for BRAF and NRAS mutations. *Sci Rep*. 2015;5:11198.
86. Johnson PJ, Lo YM. Plasma nucleic acids in the diagnosis and management of malignant disease. *Clin Chem*. 2002;48(8):1186-93.
87. Ikeguchi M, Hirooka Y, Kaibara N. Quantitative analysis of apoptosis-related gene expression in hepatocellular carcinoma. *Cancer*. 2002;95(9):1938-45.
88. Fan Y, Liu Z, Fang X, Ge Z, Ge N, Jia Y, et al. Differential expression of full-length telomerase reverse transcriptase mRNA and telomerase activity between normal and malignant renal tissues. *Clin Cancer Res*. 2005;11(12):4331-7.
89. Wu P, Zheng SB, Zuo Y, Tan WL, Yao C, Jiang YD. [Expression of human telomerase reverse transcriptase in renal cell carcinoma and its clinical significance]. *Nan Fang Yi Ke Da Xue Xue Bao*. 2008;28(2):272-4.
90. Zhou XU, Lu J, Zhu H. Correlation between the expression of hTERT gene and the clinicopathological characteristics of hepatocellular carcinoma. *Oncol Lett*. 2016;11(1):111-5.
91. Kang Y, Zhang J, Sun P, Shang J. Circulating cell-free human telomerase reverse transcriptase mRNA in plasma and its potential diagnostic and prognostic value for gastric cancer. *Int J Clin Oncol*. 2013;18(3):478-86.
92. Saeednejad Zanjani L, Madjd Z, Abolhasani M, Rasti A, Sharifabrizi A, Mehrazma M, et al. Human telomerase reverse transcriptase protein expression predicts tumour aggressiveness and survival in patients with clear cell renal cell carcinoma. *Pathology*. 2019;51(1):21-31.
93. Dupasquier S, Delmarcelle AS, Marbaix E, Cosyns JP, Courtoy PJ, Pierreux CE. Validation of housekeeping gene and impact on normalized gene expression in clear cell renal cell carcinoma: critical reassessment of YBX3/ZONAB/CSDA expression. *BMC Mol Biol*. 2014;15:9.
94. Sirera R, Bremnes RM, Cabrera A, Jantus-Lewintre E, Sanmartín E, Blasco A, et al. Circulating DNA is a useful prognostic factor in patients with advanced non-small cell lung cancer. *J Thorac Oncol*. 2011;6(2):286-90.
95. Yang YJ, Chen H, Huang P, Li CH, Dong ZH, Hou YL. Quantification of plasma hTERT DNA in hepatocellular carcinoma patients by quantitative fluorescent polymerase chain reaction. *Clin Invest Med*. 2011;34(4):E238.
96. Schwarzenbach H, Hoon DS, Pantel K. Cell-free nucleic acids as biomarkers in cancer patients. *Nat Rev Cancer*. 2011;11(6):426-37.
97. Altimari A, Grigioni AD, Benedettini E, Gabusi E, Schiavina R, Martinelli A, et al. Diagnostic role of circulating free plasma DNA detection in patients with localized prostate cancer. *Am J Clin Pathol*. 2008;129(5):756-62.

98. Sirover MA. New insights into an old protein: the functional diversity of mammalian glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase. *Biochim Biophys Acta*. 1999;1432(2):159-84.
99. Nicholls C, Li H, Liu JP. GAPDH: a common enzyme with uncommon functions. *Clin Exp Pharmacol Physiol*. 2012;39(8):674-9.
100. Wan J, Zhu L, Jiang Z, Cheng K. Monitoring of plasma cell-free DNA in predicting postoperative recurrence of clear cell renal cell carcinoma. *Urol Int*. 2013;91(3):273-8.
101. Yamamoto Y, Uemura M, Nakano K, Hayashi Y, Wang C, Ishizuya Y, et al. Increased level and fragmentation of plasma circulating cell-free DNA are diagnostic and prognostic markers for renal cell carcinoma. *Oncotarget*. 2018;9(29):20467-75.
102. Feng G, Li G, Gentil-Perret A, Tostain J, Genin C. Elevated serum-circulating RNA in patients with conventional renal cell cancer. *Anticancer Res*. 2008;28(1A):321-6.
103. Li YR, Wu JM, Wang L, Huang X, Shi J, Hu LH. Human telomerase reverse transcriptase expression and its clinical significance in laryngeal squamous cell carcinoma. *Acta Otolaryngol*. 2005;125(4):409-14.
104. Dasí F, Lledó S, García-Granero E, Ripoll R, Marugán M, Tormo M, et al. Real-time quantification in plasma of human telomerase reverse transcriptase (hTERT) mRNA: a simple blood test to monitor disease in cancer patients. *Lab Invest*. 2001;81(5):767-9.
105. Okada G, Watanabe H, Ohtsubo K, Mouri H, Yamaguchi Y, Motoo Y, et al. Multiple factors influencing the release of hTERT mRNA from pancreatic cancer cell lines in in vitro culture. *Cell Biol Int*. 2012;36(6):545-53.
106. Lledó SM, Garcia-Granero E, Dasí F, Ripoli R, García SA, Cervantes A, et al. Real time quantification in plasma of human telomerase reverse transcriptase (hTERT) mRNA in patients with colorectal cancer. *Colorectal Dis*. 2004;6(4):236-42.
107. Terrin L, Rampazzo E, Pucciarelli S, Agostini M, Bertorelle R, Esposito G, et al. Relationship between tumor and plasma levels of hTERT mRNA in patients with colorectal cancer: implications for monitoring of neoplastic disease. *Clin Cancer Res*. 2008;14(22):7444-51.
108. Miura N, Nakamura H, Sato R, Tsukamoto T, Harada T, Takahashi S, et al. Clinical usefulness of serum telomerase reverse transcriptase (hTERT) mRNA and epidermal growth factor receptor (EGFR) mRNA as a novel tumor marker for lung cancer. *Cancer Sci*. 2006;97(12):1366-73.
109. Miura N, Osaki Y, Nagashima M, Kohno M, Yoroze K, Shomori K, et al. A novel biomarker TERTmRNA is applicable for early detection of hepatoma. *BMC Gastroenterol*. 2010;10:46.
110. Silva JM, Dominguez G, Silva J, Garcia JM, Sanchez A, Rodriguez O, et al. Detection of epithelial messenger RNA in the plasma of breast cancer patients is associated with poor prognosis tumor characteristics. *Clin Cancer Res*. 2001;7(9):2821-5.
111. Dasí F, Martínez-Rodes P, March JA, Santamaría J, Martínez-Javaloyas JM, Gil M, et al. Real-time quantification of human telomerase reverse transcriptase mRNA in the plasma of patients with prostate cancer. *Ann N Y Acad Sci*. 2006;1075:204-10.
112. March-Villalba JA, Martínez-Jabaloyas JM, Herrero MJ, Santamaria J, Aliño SF, Dasí F. Cell-free circulating plasma hTERT mRNA is a useful marker for prostate cancer diagnosis and is associated with poor prognosis tumor characteristics. *PLoS One*. 2012;7(8):e43470.

9. ANEXOS

ANEXO I: Consentimiento informado Biobanco.

 COMPLEJO HOSPITALARIO UNIVERSITARIO DE ALBACETE		 sescam <small>Servicio de Salud de Castilla-La Mancha</small>	Nº Hª CLINICA <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/>
SERVICIO/SECCION:		Nº S.S.:	
Nº CAMA <input type="text"/>	CONSULTA EXT. <input type="text"/>	1º APELLIDO 2º APELLIDO: NOMBRE:	
SERVICIO DE		SEXO <input type="checkbox"/>	EDAD <input type="text"/> <input type="text"/>
		FECHA <input type="text"/>	
AUTORIZACIÓN PARA LA DONACIÓN DE MUESTRAS BIOLÓGICAS PARA BIOBANCO			
<p>D/Dña.....D.N.I. nº.....</p> <p>paciente / representante legal, declara bajo su responsabilidad haber leído y entendido la información sobre la Donación de Muestras Biológicas y haber recibido una copia de dicha información, dando su consentimiento para que se almacene y se utilice una parte de las muestras biológicas sobrantes o muestra adicional obtenida, extraídas durante el proceso asistencial (muestra de sangre, líquidos biológicos y/o tejidos), junto con la información clínica asociada, para proyectos de investigación biomédica, destinados a mejorar el conocimiento de las enfermedades.</p> <p>Albacete, a..... de..... de..... Firma:</p>			
<p>Facultativo que proporciona el documento y la explicación al paciente:.....</p> <p>..... Firma:</p>			
<p>La investigación para mejorar el conocimiento de la enfermedad que usted padece y de otras enfermedades se ve reforzada si se dispone de muestras procedentes de los pacientes (muestras biológicas humanas). De hecho muchos de los avances científicos de los últimos años en medicina son fruto de este tipo de estudios.</p> <p>Si, tras su intervención quirúrgica u otro tipo de proceso asistencial y una vez establecido el diagnóstico de su enfermedad, hay muestras sobrantes de sangre, líquido biológico y/o tejido, estos excedentes podrán conservarse para estudios de investigación biomédica.</p> <p>Si decide no donar su muestra, esta decisión no va a afectar a la atención y a los cuidados clínicos que usted precise, ni a la relación con el equipo médico que le atiende.</p> <p>Este consentimiento es voluntario e independiente de su consentimiento para ser intervenido.</p> <p>Es posible que usted no se beneficie directamente de los resultados, aunque en el futuro sí podrían beneficiarse otras personas con su misma enfermedad u otras relacionadas. Debe usted conocer que no recibirá ningún tipo de compensación por su colaboración, ni económica ni por posibles beneficios comerciales de los descubrimientos conseguidos en la investigación.</p> <p>Usted o su familia podrán utilizar las muestras almacenadas cuando sea necesario por motivos de salud, siempre y cuando estén disponibles.</p> <p>Sus muestras y los datos asociados serán custodiados por un establecimiento autorizado, el Biobanco del Complejo Hospitalario Universitario de Albacete, pasando a formar parte de su archivo, conservándose en un lugar seguro y de acceso restringido al personal del Biobanco, en las condiciones y garantías de calidad que exige la legislación vigente, y bajo la responsabilidad del propio Complejo Hospitalario Universitario de Albacete.</p>			

continúa.../...

DEBERÁ QUEDAR EN LA HISTORIA DEBIDAMENTE CUMPLIMENTADA

32

.../... continuación

De producirse un cierre del Biobanco de este centro, estará a su disposición la información del destino de sus muestras en el Registro Nacional de Biobancos para Investigación Biomédica, pudiendo manifestar su conformidad o disconformidad con el destino previsto para las mismas.

Sus muestras se identificarán mediante un código, sin hacer referencia a su nombre o a otros datos que permitan identificarle directamente. Toda la información que se obtenga será considerada como confidencial y tratada en consecuencia, de acuerdo con lo establecido en la Ley Orgánica 15/1999 de 13 de diciembre de Protección de Datos de Carácter Personal.

Sus muestras y datos relacionados con la muestra, podrán utilizarse para cualquier investigación biomédica tanto nacional como internacional en los términos que prescribe la Ley 14/2007, de 3 de julio, y el Real Decreto 1716/2011, de 18 de noviembre, pudiendo ser necesario contactar con usted para recabar datos, solicitarle muestras adicionales u otros motivos justificados pudiendo usted decidir libremente si desea colaborar.

Además tendrá a su disposición toda la información sobre los proyectos en los que se utilice su muestra y los resultados de dichas investigaciones. En determinadas ocasiones el comité de Ética externo del Biobanco o el Comité de Ética de Investigación que evaluó el proyecto podrá decidir si es imprescindible enviarle la información referente a su salud o la de sus familiares derivadas de las investigaciones, pudiendo para ello ponernos en contacto con usted. Si usted expresamente desea recibir la información deberá solicitarlo en el Biobanco del Complejo Hospitalario Universitario de Albacete.

En caso de muestras de menores de edad, éste tendrá acceso a la información cuando alcance la mayoría de edad.

Si decide donar su muestra, usted puede retirar su consentimiento en cualquier momento, procediéndose a la destrucción de las muestras sobrantes o sus materiales derivados y a la retirada de los datos asociados. También puede solicitar la anonimización de las muestras, en cuyo caso se eliminará la relación entre su material biológico y sus datos asociados. Los efectos de esta cancelación o anonimización no se podrán extender a las investigaciones anteriores que ya se hubieran llevado a cabo. Para la anulación de su consentimiento deberá solicitarlo en el Biobanco del Complejo Hospitalario Universitario de Albacete.

REVOCACIÓN

D/Dña.....D.N.I. nº.....

Paciente / representante legal, revoco el consentimiento para la DONACIÓN DE MUESTRAS BIOLÓGICAS prestado en fecha, y deseo que:

- ☐ se destruyan las muestras sobrantes o sus materiales derivados.
- ☐ se anonimicen las muestras sobrantes o sus materiales derivados.

En..... (LUGAR Y FECHA)

Fdo. EL DIRECTOR CIENTÍFICO DEL BIOBANCO,

Fdo. EL/LA PACIENTE O

REPRESENTANTE LEGAL.

Para cualquier información puede ponerse en contacto con:

Biobanco Complejo Hospitalario Universitario de Albacete
Unidad de Investigación CHUA (nuevo edificio) planta 3ª
C/ Francisco Javier de Moya, esquina C/ Laurel
02006 Albacete España
Teléfono 967597100 extensión 37088

ANEXO II. Secuencia de los cebadores y de la sonda Taqman utilizados.

AMPLIFICACION DE ADNc de GAPDH
GAPDH-upper: 5'-GAAGGTGAAGGTCGGAGTC-3'
<u>Secuencia de Cebadores:</u>
GAPDH lower: 5'-GAAGATGGTGATGGGATTTC-3'
<u>Secuencia de Sonda Taqman:</u>
5'-6-carboxi-fluoresceína-CAAGCTTCCCGTTCTCAGCC-carboxitetrametil-rodamina -3'

AMPLIFICACION DE ADNc de hTERT
hTERT-upper: 5'-TGACACCTCACCTCACCCAC-3'
<u>Secuencia de Cebadores:</u>
hTERT-lower: 5'-CACTGTCTTCCGCAAGTTCAC-3'
<u>Secuencia de Sonda Taqman:</u>
5'-6-carboxi-fluoresceína-CCCTGGTCCGAGGTGTGTCCCTGAG-6-carboxitetrametil-rodamina-3'

ANEXO III: Publicaciones, comunicaciones y premios.

El presente trabajo ha generado las siguientes:

A) Comunicaciones científicas:

1.- “Análisis de la subunidad HTERT de la telomerasa en carcinoma de células claras. Valor diagnóstico y pronóstico”. Martínez Sanchiz, Carlos; Picazo Martínez, María Granada; García Olmo, Dolores; Salinas Sánchez, Antonio S. Presentada en **XXXI Reunión Nacional de Uro-oncología**. Cádiz, 15-16 de abril de 2016.

2.- “Determinación de actividad telomerasa –subunidad hTERT- en carcinoma renal de células claras como predictor diagnóstico y pronóstico”. Martínez Sanchiz, Carlos; Picazo Martínez, María Granada; García Olmo, Dolores; Salinas Sánchez, Antonio S. Presentada en **LXXXI Congreso Nacional de Urología**. Toledo, junio de 2016.

3.- “Biopsia líquida en cáncer renal: estudio de ARNm plasmático”. perioperatorio.” Martínez Sanchiz, C; Picazo Martínez, MG; García Olmo, MD; Moreno Martínez, A; Castillo García, MD; Giménez Bachs, JM; Moreillo Vicente, L; Agustí Martínez, Esper Rueda, JA; Salinas Sánchez, AS. Presentada en **XXXII Reunión Nacional del grupo de Urología oncológica**. Bilbao, marzo de 2017.

4.- “Papel diagnóstico y pronóstico de la subunidad HTERT de la telomerasa en carcinoma renal de células renales”. Martínez Sanchiz, C; Picazo Martínez, MG; Moreno Martínez, A; Giménez Bachs, JM; Moreillo Vicente, L; Agustí Martínez, A; Flores Bautista Naranjo Romero, B; Arriaga Amador, A; García Olmo, MD; Salinas Sánchez, AS. Presentada en **XXXII Reunión Nacional del grupo de Urología oncológica**. Bilbao, marzo de 2017.

5.- “Biopsia Líquida en cáncer renal: estudio de ARNm perioperatorio”. Martínez Sanchiz, C.; Picazo Martínez, MG.; García Olmo, DC.; Moreno Martínez, A.; Castillo García, MD.; Giménez Bachs, JM.; Moreillo Vicente, L.; Agustí Martínez, A.; Díaz Piqueras, A.; Salinas Sánchez, AS. Presentada en **LXXXII Congreso Nacional de Urología**. Sevilla, junio de 2017.

Comunicación galardonada con el **PREMIO “Julián Gutiérrez de Toledo” a la mejor comunicación del congreso.

6.- ***“Valor clínico de HTERT en carcinoma de células claras renales”***. Martínez Sanchiz, C.; Picazo Martínez, MG.; García Olmo, DC.; Moreno Martínez, A.; Flores Bautista, AB.; Giménez Bachs, JM.; Moreillo Vicente, L.; Agustí Martínez, A.; Díaz Piqueras, A.; Salinas Sánchez, AS. **LXXXII Congreso Nacional de Urología**. Sevilla, junio de 2017.

7.- ***“Liquid biopsy in renal cell carcinoma: Perioperative plasmatic mRNA study”***. Martínez-Sanchiz, C; García-Olmo, DC*; Picazo-Martínez, M; García-Olmo, D; Moreno-Martínez, A; Giménez-Bachs, JM; Salinas-Sánchez, AS. Presentada en **10th Circulating Nucliec Acids in Plasma and Serum Congress. Montpellier. Francia**. Montpellier, septiembre de 2017.

8.- ***“Estudio de tres posibles marcadores para cáncer renal en biopsia líquida”***. Martínez Sanchiz, C, Martínez Picazo, MG; Piqueras Diaz, A; Flores bautista, AB; García olmo, DC; Salinas Sánchez, AS. Presentada en **XXXIII Reunión Nacional del grupo de Urología oncológica**. Jaén, abril de 2018.

9.- ***“Rendimiento diagnóstico de la cuantificación de ADN Y ARN totales en plasma de pacientes con carcinoma de células renales”***. Martínez Sanchiz, C; Picazo Martínez, MG; Diaz Piqueras, A; Flores Bautista, AB; García Olmo, DC*; Salinas Sánchez, AS. Presentada en **XXXIV Reunión Nacional del grupo de Urología oncológica**. Madrid, abril de 2019.

10.- ***“Valor pronóstico de la determinación anual de ARN y ADN total circulante en plasma en pacientes intervenidos por CCR”***. Martínez Sanchiz, C; Picazo Martínez, MG, Diaz Piqueras, A.; Flores Bautista, AB; García Olmo, DC.; Salinas Sánchez, AS. Presentada en **LXXXIV Congreso Nacional de Urología**. Bilbao, junio de 2019.

B) Artículos

1.- ***“Biopsia líquida en cáncer”***. Salinas Sánchez AS, Martínez Sanchiz, C.; Giménez Bachs, JM: *Actas Urol Esp*. 2016;40(1):1-2

2.- ***“Diagnostic and prognostic value of the detection of hTERT mRNA in renal tumours”***. Carlos Martínez-Sanchíz, Dolores C. García-Olmo, María G. Picazo-Martínez, José M. Giménez-Bachs, Ana B. Flores-Bautista, Ángela Díaz-Piqueras, Teresa Nam-Cha, Antonio S. Salinas-Sánchez. *Urol Oncol*. 2019 Apr 8.pii: S1078-14.9(19)30104-8. Doi: 10.1016/urolonc.2019.03.011. [Epub ahead of print]; 2019. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.urolonc.2019.03.011>

C) Becas

- 1.- Beca de la Asociación Contra el Cáncer de Elche de la Sierra (ACCESI) 2016.
- 2.- Beca de la Fundación para la Investigación en Urología (FIU). 2017
- 3.- Beca de la Asociación Castellano Manchega de Urología (ACMU) para proyectos de Investigación 2018. IP: Carlos Martínez Sanchiz.

D) Premios:

PREMIO “*Julián Gutiérrez de Toledo*” a la mejor comunicación del LXXXII Congreso Nacional de Urología. Sevilla, junio de 2017.



Actas Urológicas Españolas

www.elsevier.es/actasuro



EDITORIAL

Biopsia líquida en cáncer

Liquid biopsy in cancer



La presencia de ácidos nucleicos (ADN y ARN) circulantes en el plasma de pacientes con cáncer es un fenómeno de creciente interés en las 2 últimas décadas, especialmente desde 2 perspectivas: su utilidad clínica para el diagnóstico y seguimiento de los pacientes oncológicos¹, y su posible valor biológico^{2,3}.

Actualmente, el diagnóstico de buena parte de los tumores sólidos se apoya en el estudio de la pieza tumoral y en el uso de marcadores tumorales; concretamente, en la detección de antígenos tumorales en sangre, aunque estos marcadores presentan una importante limitación en cuanto a especificidad y sensibilidad. La detección en plasma de secuencias génicas propias del tumor, mediante técnicas moleculares de alta sensibilidad, se propone como una alternativa muy prometedora, tanto por sensibilidad y especificidad, como por la escasa invasividad de la técnica. De hecho, en los últimos años, se han obtenido resultados alentadores que han llevado a proponer un nuevo término, «biopsia líquida», como una forma no invasiva de diagnóstico a través del estudio de los ácidos nucleicos circulantes en plasma.

Se puede considerar que la «prueba de concepto» de la utilidad de la biopsia líquida la aportó hace 2 años un grupo británico, a través de 2 publicaciones en el *New England Journal of Medicine* y *Nature*, respectivamente, en las que mostraban que el ADN circulante en plasma es un biomarcador específico y altamente sensible para monitorizar el cáncer de mama⁴, y la resistencia a distintas terapias⁵. En estos estudios parecía cristalizar lo que muchos autores apuntaban ya desde hacía años, y animó a otros muchos a profundizar en este campo en el que, por otra parte, los resultados son muy diversos, y a veces contradictorios¹.

La mayor parte de estos trabajos se han centrado en el estudio del ADN, habiéndose descrito ya la presencia de ADN plasmático de naturaleza tumoral en pacientes con cánceres de mama, cuello uterino, colon, esófago, estómago, cabeza y cuello, hígado, riñón, páncreas, piel, nasofaringe,

ovario, próstata, pulmón, tiroides y hematológicos^{1,6,7}. En general, las alteraciones genéticas que se detectan en el ADN plasmático de estos pacientes son las mismas que están presentes en el tumor primario: mutaciones en oncogenes, inestabilidad de microsatélites, translocaciones cromosómicas, alteraciones epigenéticas o incluso ADN vírico⁸.

Pero si bien la detección de ADN mutado es ya un marcador de enfermedad cancerosa, el ADN total circulante en plasma, mucho más sencillo de detectar, parece ser también de utilidad complementaria. Por ejemplo, se ha demostrado que la cuantificación de ADN libre en plasma, mediante espectrofotometría, puede ser una herramienta mínimamente invasiva útil para el seguimiento y la detección de metástasis en pacientes con cáncer colorrectal⁹. Sin embargo, la relación entre esos niveles de DNA plasmáticos (tumorales y no tumorales) y el tamaño tumoral u otros parámetros clínicos, continúa siendo contradictoria, y algunos autores explican esta diversidad de resultados por cinéticas de liberación específicas para cada paciente⁹.

La investigación del ARN circulante en plasma comenzó de forma más tardía, aunque en la actualidad ya se cuenta con un buen número de estudios previos¹. En general, los resultados han sido sorprendentes, especialmente porque ha sido posible amplificarlo y cuantificarlo, a pesar de la alta concentración de RNAsas que existe en el suero de pacientes cancerosos.

Uno de los ARN más estudiado en plasma es el de la subunidad hTERT de la telomerasa, ya que su expresión es común a cánceres humanos muy diversos. En este hecho radica parte de su atractivo, ya que una sola técnica de laboratorio, relativamente sencilla, puede servir en distintos tipos de cáncer y, aunque su detección no nos sirva para discernir entre esos tipos de tumores, sí puede ser de gran utilidad como herramienta complementaria diagnóstica y de seguimiento. En lo que se refiere a los cánceres urológicos, la detección de mRNA de hTERT en plasma se ha propuesto como marcador para la detección y seguimiento del cáncer

<http://dx.doi.org/10.1016/j.acuro.2015.06.008>

0210-4806/© 2015 AEU. Publicado por Elsevier España, S.L.U. Todos los derechos reservados.

de próstata^{10,11}, y se ha comprobado que la detección de este ARN está muy relacionada con el estadio tumoral, sirviendo para discriminar entre enfermedad local o avanzada, y también como biomarcador no invasivo para diagnóstico de adenocarcinoma de próstata, con aumento de la sensibilidad, especificidad, valor predictivo positivo y negativo comparado con el PSA. Se puede considerar su determinación como factor pronóstico de recurrencia bioquímica y se asocia significativamente con características clínico-patológicas de mal pronóstico¹².

Respecto a los tumores vesicales, el estudio de hTERT se ha enfocado mayoritariamente en su detección en orina, apareciendo como posible marcador biológico para el diagnóstico de cáncer vesical, así como predictor de la posible recurrencia del mismo¹².

En el caso particular del cáncer renal, hasta donde sabemos, no se han realizado estudios de este tipo, a pesar de que sí se ha demostrado que los tumores tienen actividad telomerasa (expresión de hTERT mRNA).

Comparado con otros tipos de cánceres, como colon y mama, los estudios sobre cánceres urológicos que han tratado la utilidad clínica de la biopsia líquida son relativamente pocos, especialmente los basados en la detección de mRNA hTERT. Resulta de gran interés abordar este tipo de estudios ya que, como ya se ha comentado, la presencia en plasma de ácidos nucleicos libres puede tener importantes implicaciones en el diagnóstico precoz de la enfermedad. Además, su detección es técnicamente fácil de realizar a día de hoy, y se presenta como un gran aliado en el diagnóstico de multitud de tumores. Si bien todavía no está claro cómo se pueden integrar estos avances en las rutinas diarias del laboratorio hospitalario, es un avance prometedor dado que se implica en el diagnóstico precoz no invasivo, la mejoría en sensibilidad y especificidad de los marcadores tumorales actuales y, según el caso, su papel como factor pronóstico y predictor de recurrencias.

Desde el punto de vista de la fisiopatología de la enfermedad cancerosa, parece inevitable preguntarse qué significado biológico tiene la presencia de estas moléculas en el plasma. Inicialmente se consideraron como «detritus» resultantes de la muerte celular, pero posteriormente se pudo comprobar su actividad biológica. En este sentido, la «Teoría de las Genometástasis» va más allá sugiriendo que estos ácidos nucleicos libres son capaces de transfectar y transformar otras células del hospedador, dando lugar a metástasis^{2,3}.

Así pues, si bien la biopsia líquida está suponiendo ya un avance más que en el manejo de la enfermedad cancerosa, la perspectiva de que los ácidos nucleicos circulantes puedan estar directamente implicados en la progresión tumoral y el desarrollo de metástasis, supondría una nueva perspectiva para el diseño de estrategias terapéuticas. El número de estudios en este sentido crece exponencialmente, por lo que es muy previsible que en los próximos años se consoliden nuevos avances.

Bibliografía

1. González-Masiá JA, García-Olmo D, García-Olmo DC. Circulating nucleic acids in plasma and serum (CNAPS): Applications in oncology. *Onco Targets Ther.* 2013;6:819–32.
2. García-Olmo D, García-Olmo DC, Ontañón J, Martínez E. Horizontal transfer of DNA and the genometastasis hypothesis. *Blood.* 2000;95:724–5.
3. García-Olmo DC, Domínguez C, García-Arranz M, Anker P, Stroun M, García-Verdugo JA, et al. Cell-free nucleic acids circulating in the plasma of colorectal cancer patients induce the oncogenic transformation of susceptible cultured cells. *Cancer Res.* 2010;70:560–7.
4. Dawson SJ, Tsui DW, Murtarza M, Biggs H, Rueda OM, Chin SF, et al. Analysis of circulating tumor DNA to monitor metastatic breast cancer. *N Engl J Med.* 2013;368:1199–209.
5. Murtarza M, Dawson SJ, Tsui DW, Gale D, Forshaw T, Piskorz AM, et al. Non-invasive analysis of acquired resistance to cancer therapy by sequencing of plasma DNA. *Nature.* 2013;497:108–12.
6. Fleischhacker M, Schmidt B. Circulating nucleic acids (CNAs) and cancer – a survey. *Biochim Biophys Acta.* 2007;1775:181–232.
7. Jung K, Fleischhacker M, Rabien A. Cell-free DNA in the blood as a solid tumor biomarker—a critical appraisal of the literature. *Clin Chim Acta.* 2010;411:1611–24.
8. Guadalajara H, Domínguez-Berzosa C, García-Arranz M, Herberos MD, Pascual I, Sanz-Baro R, et al. The concentration of deoxyribonucleic acid in plasma from 73 patients with colorectal cancer and apparent clinical correlations. *Cancer Detect Prev.* 2008;32:39–44.
9. García Olmo DC, Picazo MG, Toboso I, Asensio AI, García Olmo D. Quantitation of cell-free DNA and RNA in plasma during tumor progression in rats. *Mol Cancer.* 2013;4:8.
10. March-Villalba JA, Martínez -abaloyas M, Herrero MJ, Santamaría L, Aliño SF, Dasi F. Plasma hTERT mRNA discriminates between clinically localized and locally advanced disease and is a predictor of recurrence in prostate cancer patients. *Expert Opin Biol Ther.* 2012; Suppl 1:S69–77.
11. March-Villalba JA, Martínez-Jabaloyas M, Herrero MJ, Santamaría L, Aliño SF, Dasi F. Cell-free circulating plasma hTERT mRNA is a useful marker for prostate cancer diagnosis and is associated with poor prognosis tumor characteristics. *PLoS One.* 2012;7:e43470.
12. Brems-Eskildsen AS, Zieger K, Tolbod H, Holcomb C, Higuchi R, Mansilla F, et al. Prediction and diagnosis of bladder cancer recurrence based on urinary content of hTERT, SENP1 PPP1CA, and MCM5 transcripts. *BMC Cancer.* 2010;10:10–646.

A.S. Salinas Sánchez^a, C. Martínez Sanchis^b, J.M. Gimenez Bachs^a y D.C. García Olmo^c

^a Servicio de Urología, Complejo Hospitalario y Universitario de Albacete, Albacete, España

^b Servicio de Urología, Hospital General de Almansa, Almansa, Albacete, España

^c Unidad de Investigación, Complejo Hospitalario y Universitario de Albacete, Albacete, España

Correo electrónico: assalinas@sescam.jccm.es (A.S. Salinas Sánchez).

ARTICLE IN PRESS



Urologic Oncology: Seminars and Original Investigations 000 (2019) 1–9

UROLOGIC
ONCOLOGY

Laboratory-Kidney cancer
Diagnostic and prognostic value of the detection of hTERT
mRNA in renal tumors

Carlos Martínez-Sanchíz, M.D.^a, Dolores C. García-Olmo, D.V.M., Ph.D.^b,
María G. Picazo-Martínez, R.Tch.^c, Syongh Y. Nam-Cha, M.D.^d,
José M. Giménez-Bachs, M.D., Ph.D.^a, Ana B. Flores-Bautista, Bs.N.^a,
Ángela Díaz-Piqueras, R.Tch.^c, Antonio S. Salinas-Sánchez, M.D., Ph.D.^{a,*}

^a Urology Departament, Complejo Hospitalario y Universitario, Faculty of Medicine, Castilla La Mancha University, Albacete, Spain^b Centre de Recerca Experimental Biomèdica Aplicada (CREBA), Institut de Recerca Biomèdica, Torrelameu, Lleida, Spain^c Research Unit, Complejo Hospitalario y Universitario, Faculty of Medicine, Castilla La Mancha University, Albacete, Spain^d Pathology Department, Complejo Hospitalario y Universitario, Faculty of Medicine, Castilla La Mancha University, Albacete, Spain

Received 8 February 2019; received in revised form 6 March 2019; accepted 13 March 2019

Abstract

Introduction: Elevated mRNA expression of human telomerase reverse transcriptase (hTERT mRNA) is common in many types of tumors, participating in tumor growth and progression. Such expression has not been sufficiently examined in renal cancer. The goal of the present study was to quantify it and analyze its possible clinical value in the management of this pathology.

Patients and methods: The study included 111 patients who underwent surgery for renal cell carcinoma (RCC) between 2015 and 2017. Tumor samples were taken from all patients and, in 94 of them, healthy renal tissue adjacent to the tumor was also sampled. The 2 types of tissue were histologically confirmed, after which mRNA was extracted. Using real-time quantitative PCR, the expression of hTERT and glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (as endogenous control) were indirectly quantified using the crossing point (CP), which is inversely correlated with the number of sample replicates yielding positive results. These values were correlated with patient socio-demographic variables and clinical-pathological factors of the RCC.

Results: The majority of patients were males, with an average age of 60.5 years (SD: 14.02). Most tumors (69.4%) were clear cell carcinomas. The most frequent stages were pT2 or lower (73%), while 5% were pN1 and 12% pM1. The majority of tumors (58%) were Fuhrman grades 1 or 2 (low grade). All samples of tumor and nontumor tissue expressed glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase mRNA, with the CP in the tumor sample significantly lower than in the nontumor tissue ($P < 0.001$). The expression of hTERT mRNA was detected in 68% of tumor tissues and significantly correlated with histopathology: 100% in sarcomatoid RCC and 77.9% in clear cell carcinomas ($P < 0.0001$). The CP was lower in pN1 ($P = 0.018$), pM1 ($P = 0.046$), and TNM IV stages ($P = 0.041$). A greater number of hTERT mRNA replicas were detected in M1 patients ($P = 0.0005$) and TNM IV stage ($P = 0.017$). There was no correlation of hTERT mRNA expression with Fuhrman grade.

Conclusions: The quantitation of hTERT mRNA expression in RCC might be useful as a complementary diagnostic tool as well as for assessing aggressiveness of the tumor. © 2019 Elsevier Inc. All rights reserved.

Keywords: Renal cell carcinoma; hTERT mRNA; Diagnosis; Prognosis

Abbreviations: CP, crossing point; hTERT mRNA, human telomerase reverse transcriptase; GAPDH, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase gene; RCC, renal cell carcinoma; ccRCC, clear cell renal cell carcinoma; BMI, body mass index

1. Introduction

Renal cell carcinoma (RCC) is the most common solid lesion in the kidney and accounts for approximately 90% of

all malignant renal tumors. There are different types of RCC, with specific histopathological and genetic characteristics [1]; the most frequent is clear cell carcinoma (ccRCC; 80%–90%), followed by papillary and chromophobe (15% and 5%, respectively). RCC shows important heterogeneity, derived from its different histological forms and its genetic

*Corresponding author. Tel.: +34967597235; fax: +34967243952.

E-mail address: assalinas@sescam.jccm.es (A.S. Salinas-Sánchez).

<https://doi.org/10.1016/j.urolonc.2019.03.011>

1078-1439/© 2019 Elsevier Inc. All rights reserved.

ARTICLE IN PRESS

2

C. Martínez-Sánchez et al. / Urologic Oncology: Seminars and Original Investigations 00 (2019) 1–9

and molecular variants, making it a difficult entity to manage and approach globally.

The diagnostic and prognostic markers in this type of cancer are based only on the clinical-pathological history (TNM, Fuhrman grade, histological type, and molecular factors) and radiological examinations, due to the lack of blood and urine markers. The search for specific markers is essential for improving the management of RCC patients, from diagnosis through to treatment and eventually follow-up [2].

Telomerase is an enzyme with an important role in the repair and lengthening of telomeres at the end of eukaryotic chromosomes, preventing cellular senescence and programmed death, and is over-expressed in a variety of tumors (such as laryngeal) [3]. Telomerase is a ribonucleoprotein that contains an internal RNA template (hTR) and a catalytic protein with reverse transcriptase action (hTERT). The expression of telomerase is practically undetectable in nontumor tissues, except for in certain cells such as stem cells, lymphocytes, germ cells, oral mucosa, or endometrium in the proliferative phase of the menstrual cycle. The expression of hTERT mRNA has been determined in 80% to 90% of human tumors and its activation has been demonstrated in premalignant lesions [4]. Due to its strong link to tumor stage, hTERT mRNA has been proposed as a marker for diagnosing and monitoring various types of cancers, such as colorectal [5], breast [6], and prostate cancer [7].

With respect to renal cancer, expression of hTERT mRNA has been detected in tumor tissues [8,9], although the clinical value of such expression has not been examined. The aim of the present study was to quantify hTERT mRNA in RCC and to determine its possible diagnostic and prognostic value in this pathology.

2. Patients and methods

We recruited 111 patients who underwent surgery for RCC between March 2015 and February 2017 in the Urology Service of the University General Hospital of Albacete (Spain). Tumor samples were removed from all patients and, in 94 of them, samples of macroscopically healthy renal tissue adjacent to the tumor were also taken. Histological analysis was performed on all samples. The study was approved by the local research ethics committee, and all samples were obtained following patients' written informed consent.

All patients with RCC diagnose during the recruitment period were included in the study. Oncocytoma cases were also included, due to its possible association with other histological subtypes. Those cases with only oncocytoma subtype, other benign conditions, and urothelial tumors were excluded.

2.1. Extraction of RNA from tumor samples and paired adjacent nontumor tissues

RNA was extracted from tissues using a commercial kit (All Prep DNA/RNA Mini; Qiagen, Hilden, Germany).

After extraction, the RNA samples were incubated with DNase I (RNase-free DNase set, Qiagen) to eliminate any contamination by DNA.

2.2. Amplification and quantitation of complementary DNA (cDNA)

Samples of complementary DNA (cDNA) were analyzed by real-time PCR with fluorescent hybridization probes for amplification of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (*GAPDH*)-specific and *hTERT*-specific sequences, respectively. In the case of *GAPDH*, we amplified a 226-bp sequence with forward and reverse primers 5'-gaaggtgaag-gtcgagtc3' and 5'-gaagatggatgggatttc-3', respectively. We used a TaqMan probe for detection and quantitation of *GAPDH* cDNA sequences. The probe was labeled at the 5' end with 6-carboxyfluorescein (FAM) dye and at the 3' end with tetramethylrhodamine (TAMRA) to yield the following oligonucleotide: 5'-FAM-caagcttcctcgttcagcc-TAMRA. In the case of *hTERT*, we amplified a 95-bp sequence with the forward and reverse primers 5'-tgacacctcacctcaccac-3' and 5'-cactgtctccgcaagtcac-3', respectively. The *hTERT*-specific TaqMan probe yielded the following sequence: 50-FAM-accctggtccgagg tgtgtccctgag-TAMRA. The probes were manufactured by TIB MOBIOL (Berlin, Germany). For PCR, we used an LC Fast Start DNA MasterPLUS Hyb Probes kit that included FastStart Taq DNA polymerase, reaction buffer, magnesium chloride, and deoxynucleotide triphosphate mixture (Roche Diagnostics GmbH). The reaction mixture contained 2 l of cDNA solution, 0.5 l of each primer, 0.2 l of probe, and 3 mM MgCl₂ for a total volume of 20 l. In all amplification experiments, DNA from RCC and water were included as positive and negative controls, respectively.

We performed all PCRs with the LightCycler System (Roche Diagnostics), using LightCycler software version 4.0. Samples were placed in capillary tubes and subjected to initial denaturation by incubation at 95°C for 5 minutes. Then, amplification was allowed to proceed for the indicated number of cycles of denaturation and annealing/extension, namely 45 cycles for amplification of *GAPDH* cDNA and 47 cycles for *hTERT* cDNA. The first step in the amplification was incubation for 15 seconds at 95°C. The annealing/extension incubation was allowed to proceed for 30 seconds at 59°C in the case of *GAPDH* cDNA and for 30 seconds at 65°C for *hTERT* cDNA. During the second incubation (annealing step), fluorescence was monitored at 530 nm (F1 channel in the LightCycler system). Each reaction was performed in triplicate.

The results of sample analysis in the LightCycler were expressed in terms of crossing point (CP) value, defined as the cycle number at which fluorescence is first detected during exponential increase of replicas (Fig. 1). The CP values are inversely proportional to the expression levels of *hTERT* mRNA.

ARTICLE IN PRESS

C. Martínez-Sánchez et al. / Urologic Oncology: Seminars and Original Investigations 00 (2019) 1–9

3

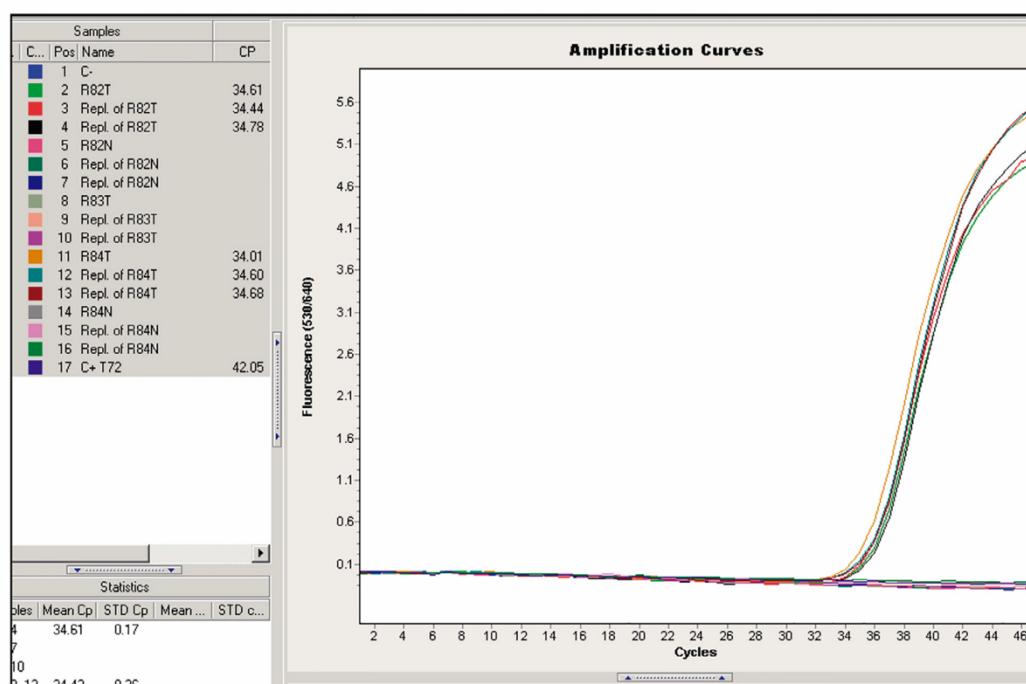


Figure 1. Graph of hTERT mRNA crossing points.

Data were obtained from patient medical records regarding age, sex, clinical diagnosis, clinical history related to the development of RCC, and anatomopathological characteristics of the tumor: laterality, size, multiplicity, histopathological diagnosis, Fuhrman grade, and TNM stage [10]. The N stages were evaluated as N1 (lymph node involvement in lymphadenectomy) and N0 (no lymph node involvement in either lymphadenectomy specimen or imaging tests).

2.3. Statistical methodology

A descriptive, bivariate analysis of the study variables was carried out. Contingency and comparison of means tests were carried out, depending on the type of variable, to determine whether there were any significant differences. In those cases, in which the application criteria of the previous tests were not valid, their corresponding nonparametric tests were used. The analysis was performed with the statistical program SPSS.

3. Results

3.1. Sociodemographic and clinical-histopathological characteristics of patients

The average age of patients was 60.5 years. A 69.4% were male; age and sex were not significantly related.

Clinical history revealed that 55.9% were smokers and 44.1% hypertensive. In addition, the average body mass index of the patients was 28.2. The predominant clinical presentation was incidental in 76.6% of patients, followed by hematuria in 9.9%. Radical nephrectomy was carried out in 79.2% of cases, with predominance of lumpectomy (35.1%), followed by laparoscopy (29.7%). Partial surgery was performed on 20.7%. Perioperative complications occurred in 7.2% (Table 1).

Regarding histopathology, 69.4% of cases were ccRCC, 11.7% papillary RCC, 9.9% chromophobe, 7.2% oncocytomas, and 1.8% were sarcomatoid carcinomas. Fifty-seven percent of cases were stage pT1, with predominance of pT1a (33%); 16% were stage pT2, and 27% were diagnosed in stages pT3 or pT4. Lymph node involvement was positive in 5.1% of patients. A 12.6% were male presented with metastatic disease, with no significant pattern in terms of location of metastases. Regarding the degree of Fuhrman differentiation, 58% of cases presented grades 1 or 2. The most frequently encountered TNM stage was I (Table 1).

3.2. Detection of GAPDH mRNA in tumor tissue and in paired adjacent nontumor tissue

All samples of tumor tissue and paired adjacent nontumor tissue expressed GAPDH mRNA, with an average CP of 24.3 in tumor samples (confidence intervals [CI] 95%:

ARTICLE IN PRESS

4

C. Martínez-Sánchez et al. / Urologic Oncology: Seminars and Original Investigations 00 (2019) 1–9

Table 1
Distribution of clinical-histopathological variables

Clinical-histopathological variables		n (%)
Sex	Men	80 (72.0)
	Women	31 (28.0)
Laterality	Right	56 (50.4)
	Left	55 (49.6)
Presenting symptoms	Incidental	89 (80.2)
	Hematuria	9 (8.1)
	Back Pain	4 (3.6)
	Pain + Hematuria	3 (2.7)
	Weight loss	2 (1.8)
	Other	4 (3.6)
Adjuvant treatment	Chemotherapy	7 (5.2)
	Radiotherapy	3 (1.7)
Body mass index	Normal	30 (26.7)
	Overweight	44 (40)
	Obesity	22 (20)
	Severe obesity	10 (9.2)
Risk factors	Morbid obesity	5 (4.2)
	HTA	64 (57.5)
	Smoking	65 (58.3)
	Neoplasm	4 (3.3)
	Renal insufficiency	4 (3.3)
Histology	Clear cell	77 (69.4)
	Papillar	13 (11.7)
	Chromophobe	11 (9.9)
	Sarcomatoid	2 (1.8)
	Oncocytomas	8 (7.2)
		7 (7.5)
Fuhrman degree	1	47 (50.5)
	2	27 (29)
	3	12 (12.9)
	4	57 (57.0)
pT	T1	16 (16.0)
	T2	2 (22.0)
	T3	5 (5.0)
	T4	94 (94.9)
N	0	5 (5.1)
	1	90 (87.3)
pM	0	13 (12.7)
	1	39 (52.7)
TNM stage	I	11 (14.9)
	II	11 (14.9)
	III	13 (17.6)
	IV	

23.6–25.01); this result is significantly lower compared to the CP of nontumor tissue (mean: 27.2 CI 95%: 26.4–28.0, $P < 0.001$).

3.3. Detection of hTERT mRNA in tumor tissue and in paired adjacent nontumor tissue

Sixty-eight percent of tumor tissue samples expressed hTERT mRNA; this occurred in only 33% of healthy tissue samples adjacent to the tumor ($P < 0.001$).

The expression of hTERT mRNA was detected in 100% of the sarcomatoid RCCs, in 77.9% of the ccRCCs and in 69.2% of the papillary RCCs. These differences in expression of hTERT mRNA according to histological subtypes were statistically significant ($P < 0.0001$). There were no

other histopathological variables associated with the expression of hTERT mRNA. These data are shown in Table 2.

There were also significant differences in the CPs of hTERT mRNA according to the different histological subtypes ($P < 0.0001$). The mean CP of hTERT mRNA was 36.6 (CI 95%: 36.1–37.1), indicating that the CP for the sarcomatoid RCCs was significantly lower than for the rest of the histological subtypes (mean: 29.2, CI 95%: 22.1–36.2); this implies greater expression of hTERT mRNA in this subtype. Table 3 shows the different CPs according to the histopathological variables analyzed and demonstrates that the CPs of metastatic tumors ($P = 0.046$; Fig. 2) with lymph node involvement ($P = 0.048$; Fig. 2) in TNM stage IV ($P = 0.041$; Fig. 3), were significantly lower in relation to those of nonmetastatic tumors, cN0, and in lower TNM stages.

All of the sarcomatoid tumors showed 3 replicas for hTERT mRNA, while in 51.9% of the ccRCCs 2 or 3 replicas were detected ($P = 0.002$). In 1 of the 8 oncocytomas (12.5%), a single replica was found.

Although 80% of the N1 cases expressed 3 replicas for hTERT mRNA, this figure did not differ significantly from that of patients with no evidence (clinical or pathological) of lymph node involvement.

According to expression or not of hTERT mRNA, there was no significant difference in the percentage of expression between pM0 and pM1 patients (Table 2). However, 85% of pM1 patients showed 3 replicas, while only 32% of M0 patients expressed such a result ($P = 0.005$).

Patients in stage TNM IV showed a higher percentage of number of replicas compared to the other TNM stages (71.5% had 3 replicas vs. an average of 32% in lower TNM stages $P = 0.017$; Fig. 4). Table 4 shows the distribution of hTERT mRNA replicas according to the different histopathological variables of the study.

4. Discussion

It has been reported that telomerase is activated in 80% to 90% of human carcinomas, but not in normal somatic cells; therefore, its detection is promising as a diagnostic marker for cancer [4,11]. With regard to renal cancer, Rohde et al. [12] evaluated the expression of hTERT mRNA in 35 cases of RCC, finding a positive result in 75% of samples. They also included 2 angiomyolipomas and 1 urinary tract tumor negative for telomerase activity, suggesting a relationship between telomerase and RCC. Furthermore, Pal et al. [11] found that after analyzing 96 cases of RCC, hTERT mRNA was significantly over-expressed in RCC tissues, whereas it remained undetected in healthy tissue samples.

In our series, we observed that 68% of tumor tissues were positive for the expression of hTERT mRNA; however, the same result occurred in 33% of healthy kidney tissue samples adjacent to the tumor. This finding is consistent

ARTICLE IN PRESS

C. Martínez-Sánchez et al. / Urologic Oncology: Seminars and Original Investigations 00 (2019) 1–9

5

Table 2
hTERT mRNA expression according to histopathological variables

Histopathological variables		hTERT mRNA expression		P
		YES n (%)	NO n (%)	
Histology	Clear cell	60 (77.9)	17 (22.1)	<0.0001
	Papillar	9 (69.2)	4 (30.8)	
	Chromophobe	4 (36.4)	7 (63.6)	
	Sarcomatoid	2 (100)	0 (0.0)	
	Oncocytomas	1 (12.5)	7 (87.5)	
Fuhrman degree	1	4 (57.1)	3 (42.9)	NS
	2	33 (70.2)	14 (29.8)	
	3	22 (81.5)	5 (18.5)	
	4	10 (83.3)	2 (16.7)	
pT	1	39 (68.4)	18 (31.6)	NS
	2	12 (75.0)	4 (25.0)	
	3	19 (86.4)	3 (13.6)	
	4	4 (80.0)	1 (20.0)	
cN	0	70 (74.5)	24 (25.5)	NS
	1	4 (98.6)	1 (1.4)	
pM	0	63 (70.0)	27 (30.0)	NS
	1	12 (92.3)	1 (7.7)	
TNM stage	I	39 (67.2)	19 (32.8)	NS
	II	11 (73.3)	4 (26.7)	
	III	11 (73.3)	4 (26.7)	
	IV	13 (92.9)	1 (7.1)	

with that of a previous study in which the expression of hTERT mRNA was detected in both tumor tissue and healthy tissue [13]. The presence of hTERT mRNA in healthy tissue has been interpreted as an effect derived from the inflammatory reaction associated with the tumor growth process, mediated mainly by lymphoid cells [4].

Table 3
Distribution of hTERT mRNA crossing points according to histopathological variables

Histopathological variables		Mean	CI 95%	P
Histology	Clear cell	36.9	36.4–37.3	<0.001
	Papillar	36.0	34.4–37.6	
	Chromophobe	37.5	36.7–38.2	
	Sarcomatoid	29.2	22.1–36.2	
	Oncocytomas	38.3	-	
Fuhrman degree	1	37.5	37.0–38.1	NS
	2	36.9	36.4–37.5	
	3	36.7	35.7–37.8	
	4	35.7	36.9–37.4	
pT	1	36.9	36.2–37.6	NS
	2	36.5	35.6–37.4	
	3	36.5	35.4–37.6	
	4	34.1	29.2–39.5	
N	0	36.7	36.2–37.2	0.018
	1	33.9	29.3–38.5	
pM	0	36.9	36.4–37.4	0.046
	1	34.9	33.1–36.8	
TNM stage	I	36.9	36.2–37.6	0.041
	II	36.6	35.5–37.6	
	III	37.4	36.6–38.1	
	IV	35.1	33.3–36.8	

On the other hand, 79% of the ccRCCs in our study showed significant expression of hTERT mRNA, a much higher rate than for other histological types (with exception of 2 cases of RCC sarcomatoid) suggesting that hTERT mRNA could serve as a marker for histological classification of RCC. Moreover, in our series, the only oncocytoma out of 8 (12.5%) that expressed hTERT was of mixed histology (with a minor sarcomatoid component), further supporting hTERT's possible role in histopathological diagnosis of RCC. The expression of hTERT mRNA in RCC has been reported in the literature, but we have not found any published data linking hTERT mRNA expression rates to different histological subtypes of RCC, as we have done in this study.

In quantifying hTERT mRNA (according to CP values), we found that patients with lymph node involvement (N1) expressed higher levels of this potential marker than N0 patients. This finding may imply that the load of hTERT mRNA in N1 patient, would be greater and, therefore, would be detected earlier, giving this data a potential prognostic value when determining hTERT mRNA.

García Olmo et al. [3] found expression of hTERT mRNA in 72% of samples from patients with laryngeal cancer, with higher rates of expression in subjects with metastasis. This phenomenon was also observed in the renal cancer patients in our study, where 92% of metastatic patients expressed hTERT mRNA in tumor samples at diagnosis. Moreover, our results agree with those of Pal et al. [11] and Zhou et al. [14], who reported increased expression of hTERT mRNA associated with tumor invasiveness.

ARTICLE IN PRESS

C. Martínez-Sánchez et al. / Urologic Oncology: Seminars and Original Investigations 00 (2019) 1–9

5

Table 2
hTERT mRNA expression according to histopathological variables

Histopathological variables		hTERT mRNA expression		P
		YES n (%)	NO n (%)	
Histology	Clear cell	60 (77.9)	17 (22.1)	<0.0001
	Papillar	9 (69.2)	4 (30.8)	
	Chromophobe	4 (36.4)	7 (63.6)	
	Sarcomatoid	2 (100)	0 (0.0)	
	Oncocytomas	1 (12.5)	7 (87.5)	
Fuhrman degree	1	4 (57.1)	3 (42.9)	NS
	2	33 (70.2)	14 (29.8)	
	3	22 (81.5)	5 (18.5)	
	4	10 (83.3)	2 (16.7)	
pT	1	39 (68.4)	18 (31.6)	NS
	2	12 (75.0)	4 (25.0)	
	3	19 (86.4)	3 (13.6)	
	4	4 (80.0)	1 (20.0)	
cN	0	70 (74.5)	24 (25.5)	NS
	1	4 (98.6)	1 (1.4)	
pM	0	63 (70.0)	27 (30.0)	NS
	1	12 (92.3)	1 (7.7)	
TNM stage	I	39 (67.2)	19 (32.8)	NS
	II	11 (73.3)	4 (26.7)	
	III	11 (73.3)	4 (26.7)	
	IV	13 (92.9)	1 (7.1)	

with that of a previous study in which the expression of hTERT mRNA was detected in both tumor tissue and healthy tissue [13]. The presence of hTERT mRNA in healthy tissue has been interpreted as an effect derived from the inflammatory reaction associated with the tumor growth process, mediated mainly by lymphoid cells [4].

Table 3
Distribution of hTERT mRNA crossing points according to histopathological variables

Histopathological variables		Mean	CI 95%	P
Histology	Clear cell	36.9	36.4–37.3	<0.001
	Papillar	36.0	34.4–37.6	
	Chromophobe	37.5	36.7–38.2	
	Sarcomatoid	29.2	22.1–36.2	
	Oncocytomas	38.3	-	
Fuhrman degree	1	37.5	37.0–38.1	NS
	2	36.9	36.4–37.5	
	3	36.7	35.7–37.8	
	4	35.7	36.9–37.4	
pT	1	36.9	36.2–37.6	NS
	2	36.5	35.6–37.4	
	3	36.5	35.4–37.6	
	4	34.1	29.2–39.5	
N	0	36.7	36.2–37.2	0.018
	1	33.9	29.3–38.5	
pM	0	36.9	36.4–37.4	0.046
	1	34.9	33.1–36.8	
TNM stage	I	36.9	36.2–37.6	0.041
	II	36.6	35.5–37.6	
	III	37.4	36.6–38.1	
	IV	35.1	33.3–36.8	

On the other hand, 79% of the ccRCCs in our study showed significant expression of hTERT mRNA, a much higher rate than for other histological types (with exception of 2 cases of RCC sarcomatoid) suggesting that hTERT mRNA could serve as a marker for histological classification of RCC. Moreover, in our series, the only oncocytoma out of 8 (12.5%) that expressed hTERT was of mixed histology (with a minor sarcomatoid component), further supporting hTERT's possible role in histopathological diagnosis of RCC. The expression of hTERT mRNA in RCC has been reported in the literature, but we have not found any published data linking hTERT mRNA expression rates to different histological subtypes of RCC, as we have done in this study.

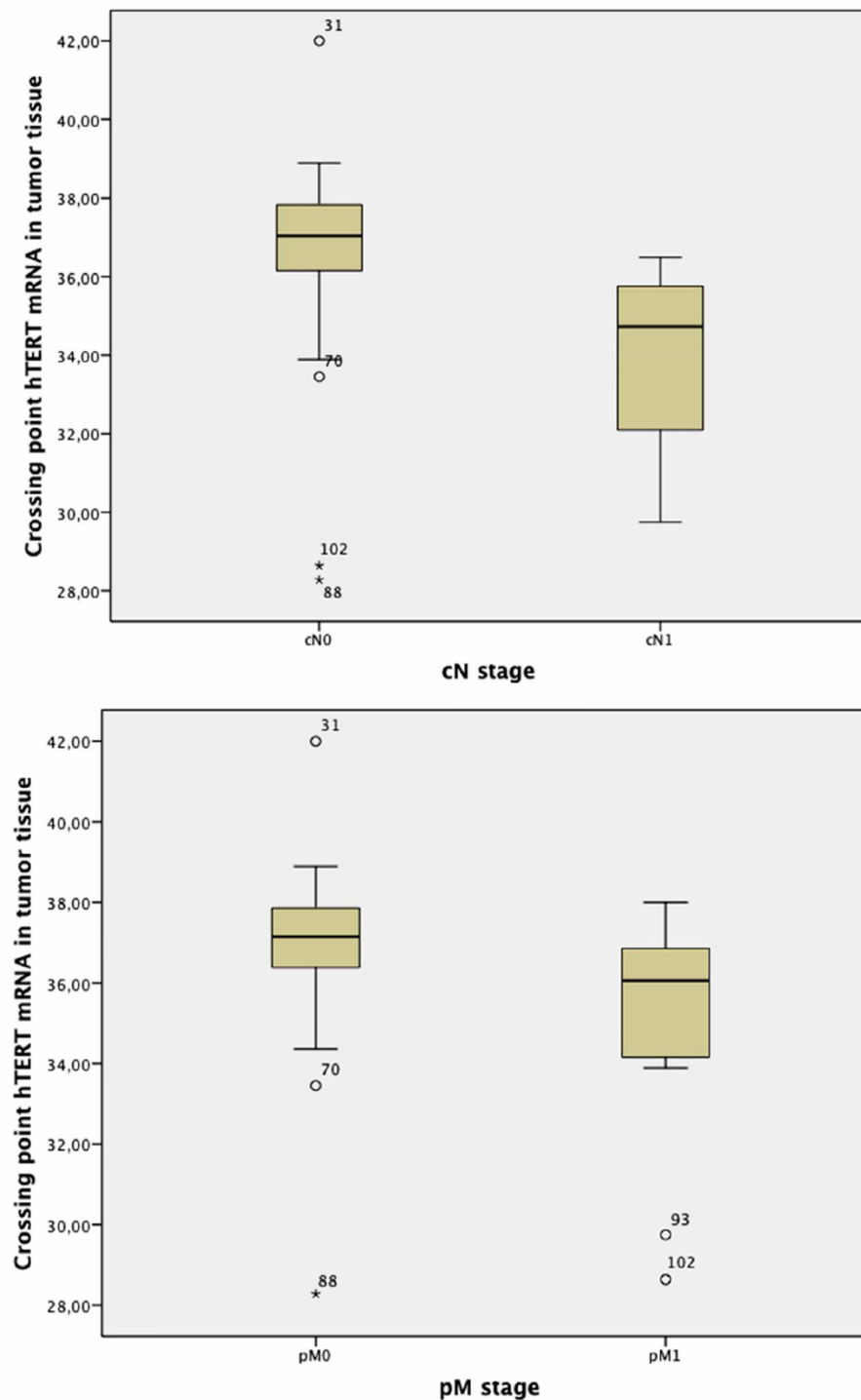
In quantifying hTERT mRNA (according to CP values), we found that patients with lymph node involvement (N1) expressed higher levels of this potential marker than N0 patients. This finding may imply that the load of hTERT mRNA in N1 patient, would be greater and, therefore, would be detected earlier, giving this data a potential prognostic value when determining hTERT mRNA.

García Olmo et al. [3] found expression of hTERT mRNA in 72% of samples from patients with laryngeal cancer, with higher rates of expression in subjects with metastasis. This phenomenon was also observed in the renal cancer patients in our study, where 92% of metastatic patients expressed hTERT mRNA in tumor samples at diagnosis. Moreover, our results agree with those of Pal et al. [11] and Zhou et al. [14], who reported increased expression of hTERT mRNA associated with tumor invasiveness.

ARTICLE IN PRESS

6

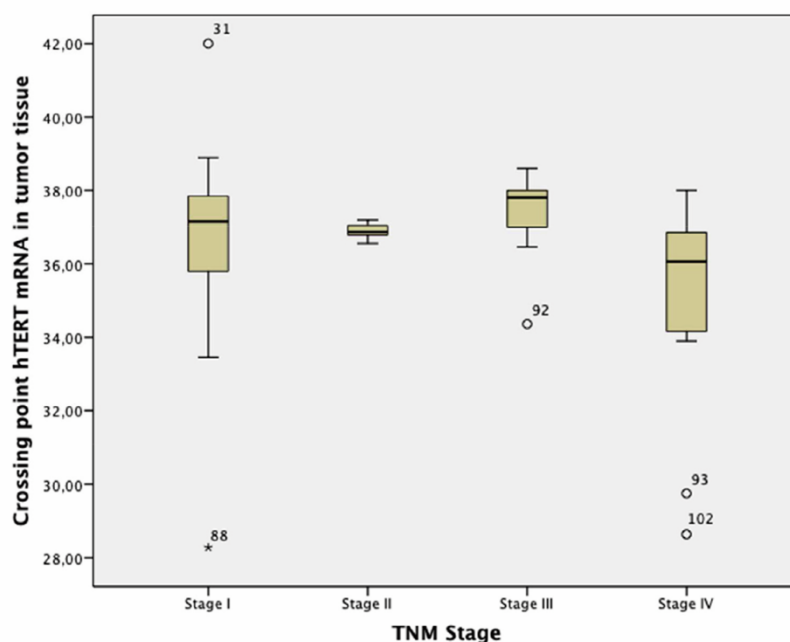
C. Martínez-Sánchez et al. / Urologic Oncology: Seminars and Original Investigations 00 (2019) 1–9

Figure 2. Crossing point hTERT mRNA in tumor tissue in cN ($P = 0.018$) and pM stages ($P = 0.046$).

ARTICLE IN PRESS

C. Martínez-Sánchez et al. / Urologic Oncology: Seminars and Original Investigations 00 (2019) 1–9

7

Figure 3. Crossing point hTERT mRNA in tumor tissue in TNM stage ($P = 0.041$).

With respect to TNM stage, no significant differences were found in the expression of hTERT mRNA in tumor tissue between the different clinical stages, although it was observed that the CP of hTERT mRNA was significantly lower in stage IV compared to earlier stages. This information, together with that obtained in our series on lymph node involvement and distant metastasis, leads us to consider the prognostic potential of this marker. Our results confirm those of previous studies [9], in which greater

expression of hTERT mRNA has been described in more advanced TNM stages, although without showing statistical significance. This suggests, nevertheless, that expression of hTERT mRNA is related to the aggressiveness of the RCC. Finally, studies on gastric cancer [15] have also found a relationship between expression of hTERT mRNA and advanced clinical stages and lymphatic invasion.

A recent publication, [16] analyzes the expression of hTERT protein by means of immunohistochemistry, showing

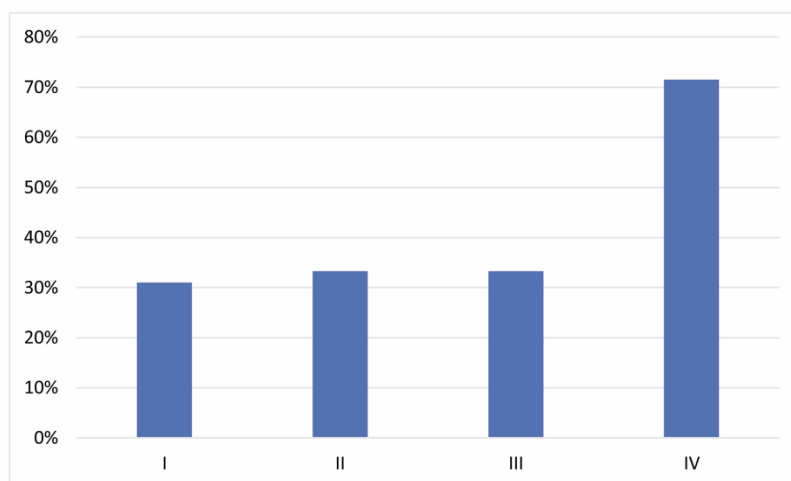


Figure 4. Percentages of 3 hTERT mRNA replicates according to TNM stage.

ARTICLE IN PRESS

8

C. Martínez-Sánchez et al. / Urologic Oncology: Seminars and Original Investigations 00 (2019) 1–9

Table 4
Number of hTERT mRNA replicates according to histopathological variables

Histopathological variables		hTERT mRNA replicates				P
		0 n (%)	1 n (%)	2 n (%)	3 n (%)	
Histology	Clear cell	17 (22.1)	20 (26.0)	10 (13.0)	30 (39.0)	0.002
	Papillar	4 (30.8)	3 (23.1)	0 (0.0)	6 (46.1)	
	Chromophobe	7 (63.6)	3 (27.3%)	0 (0.0)	1 (9.1)	
	Sarcomatoid	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	2 (100)	
	Oncocytomas	7 (87.5)	1 (12.5)	0 (0.0)	0 (0.0)	
Fuhrman degree	1	3 (42.8)	1 (14.3)	1 (14.3%)	2 (28.57)	NS
	2	14 (29.8)	9 (19.14)	5 (10.6%)	19 (40.4)	
	3	5 (18.5)	12 (44.4)	3 (11.1%)	7 (25.9)	
	4	2 (16.7)	2 (16.7)	1 (8.3%)	7 (58.3)	
pT	1	18 (31.6)	14 (24.6)	7 (13.0%)	18 (31.6)	NS
	2	4 (25.0)	6 (37.5)	0 (0.0)	6 (37.5)	
	3	3 (13.6)	6 (27.3)	2 (9.1)	11 (50.0)	
	4	1 (20.0)	0 (0.0)	1 (20.0)	3 (60.0)	
N	0	24 (25.5)	26 (27.6)	10 (10.6)	34 (36.3)	NS
	1	1 (20.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	4 (80.0)	
pM	0	27 (30.0)	25 (27.8)	9 (10.0)	29 (32.2)	0.005
	1	1 (7.7)	1 (7.7)	1 (7.7)	10 (84.6)	
TNM stage	I	19 (32.7)	14 (24.1)	7 (12.1)	18 (31.0)	0.017
	II	4 (26.7)	6 (39.1)	0 (0.0)	5 (33.3)	
	III	4 (26.7)	5 (33.3)	1 (6.7)	5 (33.3)	
	IV	1 (7.1)	1 (7.1)	2 (14.3)	10 (71.5)	

results that are coherent with ours. The authors find a greater expression of hTERT protein with the ccRCC histological subtype and that in addition, it is also associated with those cases in which ccRCC had a more aggressive behavior and in patients with more advanced disease.

Regarding expression of GAPDH mRNA in paired tumor and normal tissue, it was present in all samples, although the CP in RCC cases was significantly lower than in normal tissue samples. This finding is remarkable, since GAPDH is a housekeeping gene whose expression is stable and should not be altered according to clinical status.

Some authors [17] have found varying levels of GAPDH expression in ccRCC samples compared to their more stable expression in paired healthy tissue, from which they concluded that each tumor is unique and may present genomic instability responsible for modifications in the expression of housekeeping genes. Although we share this view in the present study, the greater cellularity associated with tumor tissue may also alter GAPDH expression in tumor samples with respect to healthy tissue.

In conclusion, the expression of hTERT mRNA is a verifiable phenomenon pertaining to RCC. Its greater expression in certain types of renal tumors, such as sarcomatoid and clear cell, together with higher levels of expression in more advanced cases of RCC, signify that determination of hTERT mRNA levels in tissue can serve as a marker for histological diagnosis with prognostic value. Studies with a larger patient series and ample follow-up time are needed to confirm our findings.

Conflict of interest

The authors do not declare conflict of interest.

Acknowledgments

This work has been funded by grants of Association Against Cancer of Elche de la Sierra (ACCESI), Foundation for Research in Urology of the Spanish Association of Urology (FIU-AEU), and the Castilla La Mancha Association of Urology.

References

- [1] Kovacs G, Akhtar M, Beckwith BJ, Bugert P, Cooper CS, Delahunt B, et al. The Heidelberg classification of renal cell tumours. *J Pathol* 1997;183:131–3.
- [2] Klatte T, Rossi SH, Steward GD. Prognostic factors and prognostic models for renal cell carcinoma: a literature review. *World J Urol* 2018;36:1943–52.
- [3] García-Olmo DC, Contreras JD, Picazo MG, López-Torres J, García-Olmo D. Potential clinical significance of perioperative levels of mRNA in plasma from patients with cancer of the larynx or hypopharynx. *Head Neck* 2017;39:647–55.
- [4] Chen CH, Chen RJ. Prevalence of telomerase activity in human cancer. *J Formos Med Assoc* 2011;110:275–89.
- [5] Bhangu JS, Taghizadeh H, Braunschmid T, Bachleitner-Hofmann T, Mannhalter C. Circulating cell-free DNA in plasma of colorectal cancer patients—a potential biomarker for tumor burden. *Surg Oncol* 2017;26:395–401.

ARTICLE IN PRESS

C. Martínez-Sánchez et al. / Urologic Oncology: Seminars and Original Investigations 00 (2019) 1–9

9

- [6] De Mattos-Arruda L, Caldas C. Cell-free circulating tumour DNA as a liquid biopsy in breast cancer. *Mol Oncol* 2016;10:464–74.
- [7] March-Villalba JA, Martínez-Jabaloyas JM, Herrero MJ, Santamaria J, Aliño SF, Dasí F. Cell-free circulating plasma hTERT mRNA is a useful marker for prostate cancer diagnosis and is associated with poor prognosis tumor characteristics. *PLoS One* 2012;7:e43470.
- [8] Kanaya T, Kyo S, Takakura M, Ito H, Namiki M, Inoue M. hTERT is a critical determinant of telomerase activity in renal-cell carcinoma. *Int J Cancer* 1998;78:539–43.
- [9] Pal D, Sharma U, Khajuria R, Singh SK, Kakkar N, Prasad R. Augmented telomerase activity, reduced telomere length and the presence of alternative lengthening of telomere in renal cell carcinoma: plausible predictive and diagnostic markers. *Gene* 2015;562:145–51.
- [10] Paner GP, Stadler WM, Hansel DE, Montironi R, Lin DW, Amin MB. Updates in the eighth edition of the tumor-node-metastasis staging classification for urologic cancers. *Eur Urol* 2018;73:560–9.
- [11] Pal D, Sharma U, Singh SK, Kakkar N, Prasad R. Inhibition of hTERT expression by MAP kinase inhibitor induces cell death in renal cell carcinoma. *Urol Oncol* 2017;35:401–8.
- [12] Rohde V, Sattler HP, Oehlenschläger B, Forster S, Zwergel T, Seitz G, et al. Genetic changes and telomerase activity in human renal cell carcinoma. *Clin Cancer Res* 1998;4:197–202.
- [13] Fan Y, Liu Z, Fang X, Ge Z, Ge N, Jia Y, et al. Differential expression of full-length telomerase reverse transcriptase mRNA and telomerase activity between normal and malignant renal tissues. *Clin Cancer Res* 2005;11:4331–7.
- [14] Zhou XU, Lu J, Zhu H. Correlation between the expression of hTERT gene and the clinicopathological characteristics of hepatocellular carcinoma. *Oncol Lett* 2016;11:111–5.
- [15] Kang Y, Zhang J, Sun P, Shang J. Circulating cell-free human telomerase reverse transcriptase mRNA in plasma and its potential diagnostic and prognostic value for gastric cancer. *Int J Clin Oncol* 2013;18:478–86.
- [16] Saeednejad Zanjani L, Madjd Z, Abolhasani M, Rasti A, Sharifabrizi A, Mehrzama M, et al. Human telomerase reverse transcriptase protein expression predicts tumour aggressiveness and survival in patients with clear cell renal cell carcinoma. *Pathology* 2019;51:21–31.
- [17] Dupasquier S, Delmarcelle AS, Marbaix E, Cosyns JP, Courtoy PJ, Pierreux CE. Validation of housekeeping gene and impact on normalized gene expression in clear cell renal cell carcinoma: critical reassessment of YBX3/ZONAB/CSDA expression. *BMC Mol Biol* 2014;15:9.